

# 学位論文

ヒト肺がん細胞における

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能と

AhR リガンドである benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) と

$\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) が細胞増殖に与える影響の解析

岩手医科大学薬学研究科

神馬瑤子

2019

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 略語表 .....  | 1  |
| 第 1 章 序論 .....   | 3  |
| 第 2 章 AhR のリガンドである benzo[a]pyrene (B[a]P) 添加による細胞数変化             |    |
| 1. 緒言 .....  | 6  |
| 2. 材料および実験方法 .....   | 7  |
| 3. 結果 .....  | 10 |
| 4. 考察 .....  | 13 |
| 第 3 章 $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) による肺がん 3D 細胞塊の細胞増殖抑制 |    |
| 1. 緒言 .....  | 16 |
| 2. 材料および実験方法 .....   | 17 |
| 3. 結果 .....  | 18 |
| 4. 考察 .....  | 20 |
| 第 4 章 3D 細胞塊における薬物代謝酵素の発現誘導                                      |    |
| 1. 緒言 .....  | 23 |
| 2. 材料および実験方法 .....   | 24 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 3. 結果.....          | 26 |
| 4. 考察.....          | 30 |
| 第5章 総合考察および結論 ..... | 33 |
| 謝辞.....             | 35 |
| 引用文献 .....          | 36 |
| 図 .....             | 45 |

## 略語表

| 略語       | 英語表記   | 日本語表記                      |
|----------|--|----------------------------|
| 3-MC     | 3-methylchoranthrene                           | 3-MC                       |
| AhR      | Aryl hydrocarbon receptor                      | アリルハイドロカーボン受容体             |
| Arnt     | AhR nuclear translocator                       | Arnt                       |
| B[a]P    | benzo[a]pyrene                                 | ベンゾエーピレン                   |
| bHLH-PAS | basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim            | bHLH-PAS                   |
| CAR      | constitutive androstane receptor               | 構成的アンドロスタン受容体              |
| DMEM     | Dulbecco's modified Eagle's medium             | ダルベッコ改変イーグル培地              |
| DMSO     | dimethyl sulfoxide                             | ジメチルスルホキシド                 |
| FBS      | fetal bovine serum                             | ウシ胎児血清                     |
| HSP90    | heat-shock-protein                             | 熱ショックタンパク                  |
| IARC     | International Agency for Research on<br>Cancer | 国際がん研究機関                   |
| PBS      | phosphate buffer saline                        | リン酸緩衝生理食塩水                 |
| PPAR     | Peroxisome Proliferator-Activated<br>Receptor  | ペルオキシソーム増殖剤応答性<br>受容体      |
| PXR      | pregunane X receptor                           | プレグナン X 受容体                |
| RNAi     | RNA interference                               | RNA (リボ核酸) 干渉              |
| RPMI     | Roswell Park Memorial Institute medium         | ロズウェルパーク培地                 |
| SD       | standard deviation                             | 標準偏差                       |
| siRNA    | small interfering RNA                          | 干渉 RNA                     |
| TBS-T    | tris buffered saline with Tween 20             | Tween-20 を含むトリス緩衝生理食<br>塩水 |

|            |                                     |                                   |
|------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| TCDD       | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin | 1, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾパ<br>ラダイオキシン |
| XAP2       | X-associated protein 2              | XAP2                              |
| XREs       | xenobiotic response elements        | XREs                              |
| $\beta$ NF | $\beta$ -naphthoflavone             | ベータナフトフラボン                        |

## 第1章 序論

肺がんは世界的に罹患率・死亡率が高い。日本では2016年にがんで死亡した人は372,986人であるが、その中でも男性では肺がんの死亡率が最も高く、女性でも肺がんによる死亡数はがんの中で二番目に多いと報告されている<sup>1)</sup>。

肺がんの原因の一つとして、タバコに含まれる発がん物質である Benzo[a]pyrene (B[a]P) が挙げられる。B[a]P は細胞質の Aryl hydrocarbon receptor (AhR) と結合して複合体を形成し、転写調節因子として遺伝子発現に関与する。この AhR と B[a]P による遺伝子発現調節が、肺における発がんに重要である。

AhR は 1972 年に初めて同定され、1982 年には 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD),  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF), B[a]P などの多環芳香族炭化水素が AhR へ結合することによって生物学的効果を発揮することが示された<sup>2,3)</sup>。AhR は basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) 転写調節因子のファミリーメンバーの一つである。AhR は細胞質内で、heat-shock-protein 90 (HSP90), X-associated protein 2 (XAP2), co-chaperone protein (p23) と複合体を形成して存在しており、リガンドが AhR に結合すると、複合体から AhR が外れ、核内に移行する。核に移行した AhR は Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) と複合体を形成して xenobiotic response elements (XREs) に結合し、遺伝子の発現調節を行っている<sup>4,5)</sup>。AhR の機能に関しては、遺伝子発現調節の他にも免疫系への関与、細胞の分化誘導や、細胞増殖など多岐にわたる。どのような作用を発揮するかは臓器や組織特異的な部分もあり、ひとくくりに AhR の機能について述べることは難しいが、AhR は肺がん細胞正常な細胞の恒常性維持に重要な分子である<sup>6,7)</sup>。

タバコには 69 成分の発がん物質が含まれており、その中のいくつかは強力な発がん促進物質であることが明らかとなっている<sup>8)</sup>。芳香族炭化水素はその中でも特に着目されて研究

が進んだ化合物であり，その発がんメカニズムが明らかになっている（図 1）．芳香族炭化水素の一種である B[a]P が AhR と結合することにより，AhR の核移行を誘導し，B[a]P / AhR 複合体は転写調節因子として，薬物代謝酵素である CYP1A1 の発現を誘導する．そこで発現誘導された CYP1A1 によって B[a]P は代謝活性化され代謝活性体となる．この代謝活性体は強力な DNA 付加体であり DNA 損傷を引き起こし，この DNA 損傷の蓄積が肺における発がんを誘導する<sup>9, 10</sup>．

また，Parsons らは肺癌初期ステージと診断されたのちの喫煙の継続は禁煙した患者と比較して再発率・死亡率が高く，予後不良であることを報告している<sup>11</sup>．さらに，肺腺がんで AhR の過剰発現が見られることや<sup>12</sup>，肺扁平上皮がんにおいては AhR の核移行，つまり AhR の活性化が患者の予後に関与しているということが報告されている<sup>13</sup>．これらの知見は，がん細胞における AhR の活性化，またその活性化を誘導する B[a]P に代表される AhR のリガンドは，肺癌細胞の進展に関与することを示唆している．しかし，がん化後の肺癌細胞内での AhR のリガンドや AhR がどのように肺癌細胞の進展に関与しているのかについては明らかとなっていない．そのため，我々は AhR が細胞増殖に関与しているという知見から，肺癌細胞における AhR を介した細胞増殖への影響に着目し，研究を開始した．

培養細胞を使う研究においては，近年，3次元培養（3D 培養）の方法が確立されており，この培養法で構築した 3次元細胞塊（3D 細胞塊）を用いた解析が広く行われている．従来の 2次元培養（2D 培養）における培養細胞は，遺伝子発現パターンなどが *in vivo* の細胞と異なる性質をもつことは以前から報告されていたが，3D 細胞塊を構築すると，いくつかの性質において *in vivo* の細胞を反映することが分かってきている<sup>14</sup>．AhR が転写調節する薬物代謝酵素の発現レベルはその 1 つであり，2D 細胞においては *in vivo* と比べて 2D 時の発現レベルが低いなどの性質の違いが報告されていた<sup>15</sup>．我々の研究室では，ヒト由来の肝臓がん細胞で 3D 細胞塊を構築し，薬物代謝酵素の発現と発現調節経路を解析し，2D

培養時と比べて薬物代謝酵素の発現が上昇することと、2D 細胞と 3D 細胞塊では発現調節経路が異なることを報告している<sup>16)</sup>。

また、薬物耐性、放射線耐性などの臨床における問題点を評価するうえで 3D 細胞塊を構築しての研究も進んでおり<sup>14, 17, 18)</sup>、3D 細胞塊にすることで生体内のがん細胞の微小環境を反映しているものとして認識されつつある。がん細胞の微小環境とは細胞間接着や、細胞に対する低酸素、低グルコースのストレス環境などがあげられるが、実際に肝臓がんの 3D 培養では細胞塊中心部が低酸素、低グルコース状態になっていることをわれわれの研究室では確認している。

本研究では、肺腺がん由来細胞株である A549、肺扁平上皮がん由来細胞株の H520 と H1703 細胞を 2D 培養、3D 培養法で培養し、AhR のリガンドである Benzo[a]pyrene (B[a]P) と  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) 処理によって、それぞれがどのような影響をうけるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。



## 第2章 AhRのリガンドである benzo[a]pyrene (B[a]P) 添加による細胞数変化

### 1. 緒言

B[a]Pは発がん性、変異原性、催奇形性が報告されており、国際がん研究機関（IARC）ではIARC発がん性リスク一覧でグループ1（ヒトに対する発がん性が認められている）に分類されている<sup>19)</sup>。また、B[a]PはAhRのリガンドであり、タバコに含まれる発がん物質の一つとして同定されており、肺の発がん誘導に最も影響がある化学物質である<sup>19)</sup>。これまでに、AhRのリガンドである2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)の処理で肺腫瘍の形成を促進するという報告や<sup>20)</sup>、B[a]P処理でヒト肺腺がん由来のA549において細胞の成長が刺激されるという報告はあるものの<sup>21)</sup>、ほとんどが肺腺がん由来細胞株での研究であり、主にタバコが原因である肺扁平上皮がん由来の細胞株を用いた研究は少ない。

Pasonsらによって肺に早期肺がんが見つかった患者がその後喫煙を続けると再発率、死亡率が上昇し予後不良であるという報告がされた<sup>11)</sup>。さらに、抗がん剤治療によりがん細胞が縮小し寛解したとされる患者でも肺がんの再発率が多いことも報告されている<sup>11)</sup>。しかし、喫煙がどのような細胞応答を介して肺がん細胞の進展を誘導しているのか、また、再発メカニズムに関しては明らかになっていない。

AhRは健常細胞の増殖促進に関与していることが明らかとなっており<sup>22)</sup>、本章では、肺がん細胞でもAhRが細胞増殖に関与していると仮説を立て、肺腺がん細胞と肺扁平上皮がん細胞を用いてタバコに含まれるB[a]Pが肺がん細胞の細胞増殖に与える影響を検討した。

## 2. 材料および実験方法

### 2-1. 培養細胞および試薬

A549（ヒト肺線がん細胞, ATCC No.: CCL-185）を, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose: 4.5 g/LD-glucose; Gibco, Grand Island, NY, USA) にて, H520, H1703（ヒト肺扁平上皮がん細胞, ATCC No.: HTB-182, CRL-5889）は Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Gibco, Grand Island, NY, USA) に 10% fetal bovine serum (Hyclone, south Logan, VT, USA, Lot AZM197211) および 1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Incorporated, USA) を添加したものをを用いて, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した. 2D 細胞は細胞濃度  $1.0 \times 10^5$  cells/mL になるように調節し 24 well プレート (Corning Incorporated, USA) に 800  $\mu$ l で播種した. 3D 細胞塊は, 1000 cells / spheroid となるように濃度調整し低吸着性の Prime Surface 96V Plate (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を用いて培養した.

### 2-2. 試薬

B[a]P (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) は, dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒に 10 mM ストックを作製し, 培養液で最終濃度 10  $\mu$ M となるように濃度調整して使用した. DMSO の最終濃度は 0.1% になるように培養液で希釈して使用した.

### 2-3. RNA 干渉法 (RNAi)

RNA 干渉法 (RNAi) は 肺がん細胞株における AhR をノックダウンするために行った.

ヒト *AhR* mRNA (HSS100336; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) をターゲットとしているものを購入した.

siRNA の配列 : 5'-CCUUUAAUGGAGAGGUGCUUCAUUAU-3'

5'-AUAUGAAGCACCUCUCCAUUAAGG-3'

ネガティブコントロールとしてコントロール siRNA (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, SIC001-10; Sigma-Aldrich, Merck KGaA) を使用した. 肺がん細胞株へのトランスフェクションは Lipofectamine™ RNAi MAX reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Incorporated, USA) を用いた. 3 種類の細胞株の 2D 細胞と 3D 細胞塊共に siRNA の最終濃度が 10 nM siRNA となるようにした.

#### 2-4. ウェスタンブロット法

2D 細胞は RNAi 処理をしたもの (None, Control siRNA, AhR siRNA) を  $1 \times 10^5$  細胞 /90-mm ディッシュにて播種し 48 時間, 72 時間培養の時点で 1 サンプルあたり 2 ディッシュからサンプリングした. 3D 細胞は同じく RNAi 処理したものを 1 サンプルあたり 288 個でサンプリングした. サンプリングには RIPA 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 1%NP-40 および 0.1%SDS を含む) を使用した. タンパク濃度はブラッドフォード法を用いて定量し, 1 穴あたり 10 $\mu$ g の総タンパク試料を 10%SDS-PAGE にて分離し, PVDF メンブレンに転写した. その後, Blocking One (Nacalai, Kyoto, Japan) を使用して 60 分間, 室温で振盪させながらブロッキングを行い, TBS-T (0.1% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水) で洗浄した. 1 次抗体は, Can Get Signal Solution 1 (Toyobo Life Science, Osaka, Japan) でそれぞれ希釈し, 90 分室温で振盪しながら反応させた. 抗 AhR 抗体 (sc-133-88, Santa Cruz Biotechnology, USA) は A549, H520 は 1000 倍希釈, H1703 は 500 倍希釈で用いた. 抗  $\beta$ -actin 抗体 (cat. No. A1978, Sigma-Aldrich; Merck

KGaA) は 1000 倍希釈にて用いた。1 次抗体反応後, 2 次抗体として Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (7076S Cell Signaling) を Can Get Signal Solution 2 (Tokyo Life Science, Osaka, Japan) で 1000 倍希釈し, 室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後, LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) でバンドを検出した。

## 2-5. 細胞数測定

2D 細胞, 3D 細胞塊ともに培養開始後 24 時間経過時に B[a]P を添加し, その後, 継続的に細胞数の測定を行った。

2D 細胞: 培養プレートから 0.25%トリプシン処理にて細胞を剥がし 1.5ml チューブに回収。血球計算盤を用いて細胞数の測定を行った。

3D 細胞塊: 8 spheroid / sample でサンプリングし, 細胞塊を 0.25%トリプシン 50  $\mu$ l 加えて 37°C, 5%インキュベーターで 5 分間インキュベート。その後細胞塊から細胞を剥離させ, 凝集状態から単細胞が浮遊するまでピペッティングを行った。浮遊した単細胞を, 血球計算盤を用いて細胞数測定を行った。各細胞数の測定は独立した実験を 3 回行い, 平均値および標準偏差を算出した。得られたデータはそれぞれの実験のコントロール

(DMSO 添加サンプルまたは Control siRNA 処理サンプル) と B[a]P 添加サンプルまたは AhR siRNA 処理サンプルの間で  $t$  検定によって統計処理を行い, 有意差については,  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 2-6. PI 染色

2D 細胞, 3D 細胞塊共に細胞数カウントと同様の方法でサンプリングした。その後, propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加え 5 分間室温にて静置,

光学顕微鏡にてイメージの取得を行った。1 サンプルにつき、ランダムに 5 回のイメージ取得を行い、(PI 染色された細胞 / イメージ内全ての細胞数) を算出した。独立した実験を 3 回繰り返し、平均値および標準偏差を算出した。得られたデータはコントロール siRNA 処理サンプルと AhR siRNA 処理サンプルの間で  $t$  検定によって統計処理を行った。有意差については、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 3. 結果

#### 3-1. 3次元培養による 3D 細胞塊の構築

肺がん 3D 細胞塊は、培養開始して 24~48 時間で凝集塊を作ることを確認した (図 2A)。そして、通常の培養時の細胞増殖は 2D 細胞と同様に 3D 細胞塊でもみられることを確認した (図 2B)。しかし、細胞増殖のレベルは 2D 細胞よりは緩やかであった。

#### 3-2. B[a]P 添加は 3D 細胞塊において細胞数を増加させる

AhR はヒト肺がん細胞の増殖を促進する分子であることが報告されており<sup>23)</sup>、実際に AhR のリガンドである  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) や 3-methylchoranthrene (3-MC) は A549 の 2D 細胞において細胞の増殖を誘導することが報告されている<sup>24, 25)</sup>。また、B[a]P を用いた研究でも A549 では細胞増殖が刺激されることが報告されており<sup>21)</sup>、我々は AhR がリガンドによって活性化されることで肺腺がん細胞、肺扁平上皮がん細胞の細胞増殖を増強していると予測した。本実験の培養タイムスケジュールは図 3A に示す。

2D 培養した細胞への B[a]P 処理では、DMSO 添加サンプル (以下 DMSO 添加サンプルをコントロールと表記する) と比較しても細胞数に変化は見られなかった (図 3B)。一

方で、3D 細胞塊への B[a]P 添加では、コントロールと比較して細胞数が有意に増加した (図 3C)。この結果より、B[a]P 添加の細胞増殖への影響は 2D 培養と 3D 細胞塊の間では違いがあることが示唆され、B[a]P は肺癌 3D 細胞塊において細胞の増殖を増強させるということが明らかになった。

### 3-3. 3D 細胞塊における B[a]P 誘導性の細胞増殖の増強は AhR を介す

3D 細胞塊における B[a]P 添加による細胞数増強が AhR を介すかどうかについて、*AhR* ノックダウン処理後に B[a]P を添加して細胞数を測定した。*AhR* ノックダウン処理をした細胞へ B[a]P 添加の培養タイムコースは図 4A に示した通りである。*AhR* ノックダウンによる AhR の遺伝子発現とタンパク発現の結果を図 4B に示す。ノックダウン処理によって AhR の遺伝子発現量、タンパク発現量は共に細胞数測定を行うタイムコース内では抑制されていることを確認した。

ノックダウン処理後に B[a]P を添加すると、None の細胞とコントロール siRNA 処理細胞では細胞の増殖がみられたが、*AhR* をノックダウンした細胞では B[a]P を添加しても細胞数の増加は見られないという結果を得た (図 4C)。この結果から、肺癌 3D 細胞塊への B[a]P 添加による細胞数の増加は AhR を介していることが示唆された。

### 3-4. AhR は 2D 培養、3D 細胞塊ともに細胞増殖に関与する

*AhR* をノックダウンした A549 の 2D 培養では細胞数が減少するという事はこれまでに Shimba らによって報告されている<sup>24)</sup>。肺扁平上皮がん由来の細胞株である H520, H1703 でも AhR 自体が細胞増殖に関与しているかどうか *AhR* をノックダウンした 2D 細胞と 3D 細胞塊の細胞数の測定により検討した。*AhR* をノックダウン処理しての培養スケ

ジュールを図 5A に示す。その結果, *AhR* をノックダウンすると A549 だけでなく H520, H1703 の細胞数も 2D 細胞で細胞数の有意な減少が見られた (図 5B)。さらに, 3D 細胞塊においても *AhR* をノックダウンすると Control 群 (None と Control siRNA) では細胞増殖は確認できるが, *AhR* siRNA 処理では細胞数が有意に減少することが明らかとなった (図 5C)。本結果より, 肺腺がん細胞と肺扁平上皮がん細胞共に *AhR* をノックダウンすると細胞数が減少するということが明らかとなり, *AhR* は肺がん細胞の細胞増殖に必須の分子であることが示唆された。

### 3-5. *AhR* のノックダウンによる細胞死誘導の検討

*AhR* のノックダウンによって細胞数が少なくなるという現象は細胞死が誘導されているためにおこる現象ではないかと推測した。そこで *AhR* をノックダウンすることで細胞死が誘導されている細胞を検出するため, 2D 細胞と 3D 細胞塊でそれぞれ *AhR* ノックダウン処理後 48 時間と 96 時間の細胞を propidium iodide (PI) 染色により染色し, 染色された細胞を細胞死が誘導されている細胞としてカウントした。2D 細胞での PI 染色では, *AhR* ノックダウン後 48 時間, 96 時間経過で PI 染色によって染色される細胞はコントロール siRNA 処理細胞と比較して有意な差は見られなかった (図 6)。また, 3D 細胞塊の PI 染色では, *AhR* ノックダウン後 48 時間, 96 時間経過のいずれにおいても, A549, H520, H1703 すべての細胞においてコントロール siRNA 処理した細胞と比較して PI 染色によって染色される細胞の増加はみられなかった。以上より *AhR* をノックダウンした細胞でみられた細胞数の減少は, 細胞死の誘導によるものではないことが示唆された。

#### 4. 考察

AhR は 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) や B[a]P,  $\beta$ NF といった環境汚染物質や発がん化学物質の受容体であり、これらのリガンドが結合することで、様々な遺伝子の転写誘導を活性化することが報告されている<sup>26)</sup>。これらの AhR による遺伝子発現誘導は、最終的に細胞の生存や組織の恒常性維持につながるということが証明されている<sup>27)</sup>。また、AhR は細胞周期を介して細胞増殖に関与していることが示唆されている<sup>28)</sup>。細胞周期への関与は、細胞増殖を促進させる方向だけでなく細胞増殖を停止させる方向にも関与していることが明らかになっており<sup>28)</sup>、臓器やがん種によって異なることが報告されている<sup>29,30)</sup>。

AhR のリガンドである B[a]P を用いた研究においては、Swiss mouse 3T3 細胞は B[a]P を処理すると細胞増殖が抑制されるということが Vaziri and Faller らによって報告されているが<sup>31)</sup>、最近ではヒト肺腺がん由来の A549 において B[a]P は細胞の成長を刺激するという報告もある<sup>21)</sup>。しかし、ヒト肺扁平上皮がん細胞においては B[a]P の影響は明らかになっていない。

私はヒト肺扁平上皮がん細胞でも B[a]P によって細胞増殖が刺激されるかどうかを検討した。その結果、ヒト肺腺がん由来の A549 だけでなく、ヒト肺扁平上皮がん由来の H520, H1703 の 3D 細胞塊においても B[a]P 処理をした細胞では細胞数の増加がみられ、細胞増殖が増強されるということが明らかになった。さらに、この結果は 2D 培養した肺がん細胞では見られず、2D 細胞と 3D 細胞塊とでは B[a]P の細胞増殖への影響が異なるという結果を得た (図 3A, B)。また、肺がん 3D 細胞塊における B[a]P の細胞増殖を誘導するという作用は、AhR をノックダウンした細胞へ B[a]P を添加しても細胞数の増加がみられないという結果より (図 4C)、AhR を介していることが明らかになった。

我々の研究室ではこれまでに、肝臓がん細胞において遺伝子の転写調節は 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは異なることを報告している<sup>16)</sup>。加えて、ヒト肝臓がん細胞の HepG2 では、化



学的な反応が 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは異なるということが報告されている<sup>15)</sup>。この報告では、pregunane X receptor (PXR) と constitutive androstane receptor (CAR) に化学的な刺激を加えると、2D 細胞と 3D 細胞塊では遺伝子の転写調節の制御が異なるというものである<sup>15)</sup>。AhR は細胞増殖関連遺伝子の転写制御に関与している報告もあり<sup>6,7)</sup>、以上のことから私は、2D 細胞と 3D 細胞塊とで B[a]P による細胞増殖への影響が異なる理由として AhR を介した細胞増殖関連遺伝子の転写調節機構が異なっているのではないかと推測している。

一方で、リガンド無処理の培養細胞で *AhR* をノックダウンすると、使用した全細胞株で細胞数が減少するという結果となった。*AhR* ノックダウンによる細胞数減少の影響は 3D 細胞塊のみではなく 2D 細胞でも確認され、肺がん細胞における AhR を介した細胞増殖のメカニズムは、B[a]P 処理という外来刺激があった場合と無処理での培養時とは異なっていることが示唆された。

本実験によって得られた結果から AhR を介した細胞増殖のメカニズムについて、現段階で考えられる 2 つの仮説を図 7 に示す。

一つは、3D 細胞塊における B[a]P/ AhR 複合体は AhR の核移行を促進することで細胞増殖に関与する遺伝子の発現を誘導し細胞増殖を増強するが、2D 細胞では細胞増殖に関与する遺伝子の発現が誘導されないということである (図 7A)。

これまでに、喫煙によって肺細胞内で形成される B[a]P/ AhR 複合体は肺の発がんを引き起こす原因の一つであることが明らかにされており<sup>9,10)</sup>、さらに、肺の発がん後の喫煙の継続は治療後の再発率、死亡率を上昇させ予後不良となることが報告されている<sup>11)</sup>。このように、肺がんの進展に喫煙が大きく影響していることが考えられるが、その肺がんの進展が、どのような細胞応答によるものであるのか明らかになっていなかった。

本研究で構築した 3D 細胞塊の大きさは 200  $\mu\text{m}$  ほどであるので、生体内での微小ながんを反映している可能性がある。つまり、肺がん細胞が体内にある場合、喫煙者の肺がん細胞

は、非喫煙者の肺がん細胞よりも増殖が速いと予測される。増殖が速ければ、がん細胞塊の成長も早く、血管新生などのがんの進行も早くなり、予後不良の結果を招くのではないかと考えられる（図 7A）。

もう一つは、肺がん細胞において AhR は細胞増殖に重要な分子であるということである（図 7B）。AhR の細胞増殖への関与にはリガンドが結合することによる AhR の核移行が重要と報告されているが<sup>24</sup>、今回の場合、外来のリガンドを加えていない状態で AhR の細胞増殖への関与が明らかとなったため、内因性のリガンドの存在が推測された。AhR の内因性のリガンドについては肝臓がん細胞のグルコース飢餓ストレスによる AhR の核移行促進<sup>32</sup>、トリプトファン代謝経路の代謝物が AhR の内因性リガンドとなり得ることが報告されている<sup>34</sup>。

今後は転写調節される肺がん細胞における細胞増殖関連遺伝子の特定、2D 細胞と 3D 細胞塊での制御の違いを明らかにすること、また内因性のリガンドを明らかにすることが課題である。

本章ではタバコに含まれる AhR のリガンドである B[a]P の細胞増殖への影響が 2D 細胞と 3D 細胞塊で異なることが明らかになった。次の展開として 3D 細胞塊での肺がん細胞の増殖メカニズムを明らかにするため、同じ AhR リガンドであれば細胞増殖を増強するのではないかと予測し、他の AhR リガンドである  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) が 3D 細胞塊の細胞増殖へ与える影響を検討した。

### 第3章 $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) による肺がん 3D 細胞塊の細胞増殖抑制

#### 1. 緒言

$\beta$ NF は、B[a]P と同じ AhR のリガンドとして知られている比較的毒性が少ない合成フラボノイドであり、AhR に結合することで CYP1A family などの第一相薬物代謝酵素などの遺伝子発現を誘導する<sup>35)</sup>。B[a]P は肺がんの発がんを誘導するとしてよく知られているが、逆に  $\beta$ NF は肺の腫瘍発生を抑制することがマウスにおける研究より明らかになっている<sup>36)</sup>。さらに、ヒト乳がん細胞においても、 $\beta$ NF は AhR を介して細胞周期をコントロールし細胞増殖を抑制することで抗腫瘍効果を示す<sup>37)</sup>ことが報告されている。この  $\beta$ NF の効果は B[a]P とは逆の効果であるが、ヒト肺がん細胞の A549 の 2D 細胞への  $\beta$ NF 添加は細胞増殖を亢進したという報告もある<sup>24)</sup>。以上のように、肺がんにおける  $\beta$ NF のがんへの作用はいまだ明確とはなっていない。

前章では、タバコに含まれる AhR リガンドの benzo[a]pyrene (B[a]P) が 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは細胞増殖へ与える影響が異なることを明らかにした。B[a]P による AhR を介した細胞増殖は 3D 細胞塊においてのみ確認できた。本章では、3D 細胞塊での細胞増殖メカニズムの解明のため、B[a]P と同じ AhR リガンドである  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) を添加して細胞増殖への影響を検討した。

## 2. 材料および実験方法

### 2-1. 培養細胞および試薬

A549 (ヒト肺線がん細胞, ATCC No.: CCL-185) を, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose: 4.5 g/LD-glucose; Gibco, Grand Island, NY, USA) にて, H520, H1703 (ヒト肺扁平上皮がん細胞, ATCC No.: HTB-182, CRL-5889) は Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Gibco, Grand Island, NY, USA) に 10% fetal bovine serum (Hyclone, south Logan, VT, USA, Lot AZM197211) および 1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Incorporated, USA) を添加したものをを用いて, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した.

3D 細胞塊は, 1000 cells / spheroid となるように濃度調整し, 低吸着性の Prime Surface 96V Plate (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を用いて培養した.

### 2-2. 試薬

$\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) は, dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒に 10mM ストックを作製し, 培養液で最終濃度 1  $\mu$ M または 10  $\mu$ M となるように濃度調整して使用した. DMSO の最終濃度は 0.1% になるように培養液で希釈して使用した.

### 2-3. 細胞数測定

培養開始後 24 時間経過時に  $\beta$ NF を添加し, 添加した後, 継時的に細胞数の測定を行った. 3D 細胞塊 : 8 spheroid / sample でサンプリングし, 細胞塊を 0.25% トリプシン 50  $\mu$ l

加えて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 分間インキュベートした。その後細胞塊から細胞を剥離させ、凝集状態から単細胞が浮遊するまでピペッティングを行った。浮遊した単細胞を、血球計算盤を用いて細胞数測定を行った。

各細胞数の測定は独立した実験を 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。得られたデータはコントロール (DMSO 添加サンプル) と βNF 添加サンプルの間で *t* 検定によって統計処理を行い、有意差については、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 2-4. PI 染色

細胞数カウントと同様の方法でサンプリングする。その後、propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加え 5 分間室温にて静置、光学顕微鏡にてイメージの取得を行った。1 サンプルにつき、ランダムに 5 回のイメージ取得を行い、(PI 染色された細胞 / イメージ内全ての細胞数) を算出した。独立した実験を 3 回繰り返し、平均値および標準偏差を算出した。得られたデータはコントロール (DMSO 添加サンプル) と βNF 添加サンプルの間で *t* 検定によって統計処理を行った。有意差については、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 3. 結果

### 3-1. βNF が肺がん細胞に与える影響

βNF はこれまで薬物代謝動態学分野で焦点をあてて解析してきた Aryl hydrocarbon receptore (AhR) のリガンドであり、*CYP1A* ファミリーの遺伝子発現を誘導する。これまでに同様の AhR リガンドである B[a]P / AhR 複合体は肺における発がん重要な影響を

及ぼしていることに加えて、本研究では B[a]P はがん化後の肺がん 3D 細胞塊の増殖を増強することを明らかにしてきた。これらの結果から、AhR のリガンドである  $\beta$ NF も肺がんの細胞の細胞増殖になんらかの影響を及ぼすと考えられる。

$\beta$ NF 添加による培養スケジュールは図 8A に示した通りである。 $\beta$ NF を 1  $\mu$ M 加えた場合、A549 と H1703 の 3D 細胞塊において細胞数にはコントロール（以下 DMSO 添加サンプルをコントロールと表記する）と比較して差は見られなかったが、H520 の 3D 細胞塊においては  $\beta$ NF 添加から 72 時間後にコントロールと  $\beta$ NF 添加サンプルの間で細胞数に有意な差がみられた（図 8B）。 $\beta$ NF の効果出現のための最適濃度に関する論文では 10  $\mu$ M が適しているということが証明されており<sup>38)</sup>、本実験でも 10  $\mu$ M へ濃度をあげて細胞数を測定した。その結果、10  $\mu$ M の  $\beta$ NF 添加では、A549、H520、H1703 のすべての 3D 細胞塊でコントロールと比較して細胞数はコントロールより有意に少ないという結果を得た（図 8B）。これらの結果から、 $\beta$ NF はヒト肺がんの細胞の増殖に対して、増殖を誘導する B[a]P とは逆の効果を持つことが示唆された。

### 3-2. $\beta$ NF 添加による細胞死誘導の検討

$\beta$ NF 添加によってコントロールよりも細胞数が少なくなる現象について、私は  $\beta$ NF が細胞死を誘導することが原因ではないかと予想した。 $\beta$ NF 添加によって細胞死が誘導されているのかを確認するために、 $\beta$ NF 1  $\mu$ M および 10  $\mu$ M を添加後 48 時間と 72 時間の細胞をそれぞれ propidium iodide (PI) で染色し、染色された細胞を細胞死が誘導されている細胞としてカウントした。

1  $\mu$ M  $\beta$ NF を添加した場合は H1703 の  $\beta$ NF 添加後 72 時間のサンプルでのみ、コントロールとの間に PI によって染色される細胞が有意に増加した（図 9）。10  $\mu$ M  $\beta$ NF を添加した A549 と H520 においては、PI によって染色される細胞数にはコントロールと差がなか

った。しかし、H1703 では、 $\beta$ NF 添加後 48 時間と 72 時間でいずれにおいてもコントロールと比較して有意な死細胞数の増加が認められた (図 9)。

#### 4. 考察

結果より、A549, H520, H1703 のすべての細胞株において、 $10\mu\text{M}$  の  $\beta$ NF を添加した 3D 細胞塊ではコントロール (DMSO 添加サンプルを以下コントロールと表記する) と比較して細胞数が減少する結果を得た (図 8B)。 $\beta$ NF の細胞増殖へ与える影響は B[a]P が細胞増殖を増強する影響とは逆に、細胞増殖を抑制させることが示唆された。

細胞数が減少するという結果は細胞死の誘導が原因かどうかを確認するため、PI 染色により細胞死が引き起こされている細胞を検出した結果、PI によって染色される細胞数は、A549, H520 では  $\beta$ NF を添加した細胞塊とコントロールの細胞塊とでは有意な差は見られなかった (図 9)。この結果から、A549 と H520 では  $\beta$ NF 添加による細胞塊を構成する細胞数の減少は細胞死の誘導によるものではないことが明らかとなった。一方で H1703 においては、 $\beta$ NF を添加した細胞塊で PI によって染色される細胞が  $1\mu\text{M}$  では添加後 48 時間、 $10\mu\text{M}$  では添加後 48 時間と 72 時間でコントロールと比較して有意に増加していた (図 9)。この結果から、H1703 では  $\beta$ NF 処理による細胞数の減少は細胞死の誘導が原因の一つであることが予測された。

$\beta$ NF が関与しているヒト乳がん細胞における抗腫瘍効果は、 $\beta$ NF / AhR 複合体の細胞周期への関与によるものと報告されている<sup>37)</sup>。A549 と H520 に関しては PI 染色の結果より細胞数の減少が細胞死によるものではないことから、 $\beta$ NF の添加によって細胞周期が遅延、または停止し、その結果として細胞数が減少していることが推測される。一方で H1703 においては  $\beta$ NF 添加により細胞死が誘導されており、同じ肺がん細胞でも細胞株の種類によって  $\beta$ NF による細胞応答が異なることが明らかになった。これまでに、培養細胞株の種

類が違くと遺伝子プロファイルが異なり化合物に対する反応も異なることが報告されている<sup>39)</sup>。H1703とA549, H520で $\beta$ NFに対する反応の違いを証明するためにはマイクロアレイ等で $\beta$ NF添加した際の細胞株ごとの遺伝子変化の違いを比較する必要がある。

また、本研究で得られた $\beta$ NFが3D細胞塊の細胞数を減少させるという分子メカニズムとして、 $\beta$ NFはAhRのリガンドであるためAhRを介していると推測される。しかし、AhR自体が肺がん細胞の細胞増殖に重要な分子であることが明らかになったため、AhRノックダウンと $\beta$ NF添加による細胞数変化を同時に行うには、実験系の改善が必要であり、現段階ではAhRを介しているかどうかは明らかにできていない。

A549, H520における $\beta$ NFの細胞数の減少にAhRが関与していると仮定した場合の細胞増殖メカニズムの仮説を図10に示す。これまでの研究で、AhRは外来リガンドがない状態でも細胞増殖に関与していることが明らかになっている。この場合、生体内のAhRリガンドによってAhRが活性化され、転写調節機能によって細胞増殖を誘導する遺伝子が発現し、細胞増殖が誘導されると予想される(図7B)。図10Aでは、 $\beta$ NFも生体内リガンドと同じようにAhRに結合するが、 $\beta$ NF/AhR複合体が発現誘導する遺伝子群は細胞増殖を抑制する遺伝子であるという仮説を示している。リガンドそれぞれの結合能の違いによって細胞増殖へ及ぼす影響が異なることが示唆されており<sup>40)</sup>、生体内リガンド/AhR複合体の作用よりも $\beta$ NF/AhR複合体の作用の方が相対的に強いため、結果として細胞増殖が抑制される可能性が考えられる。一方で、 $\beta$ NFにはAhR非依存のCYP1Aの誘導経路があることや<sup>41)</sup>、肝がん細胞ではAhRリガンドがAhR非依存的に細胞の増殖へ関与している可能性が示唆されており<sup>42)</sup>、図10Bでは、生体内リガンド、 $\beta$ NFのどちらが結合しても、B[a]Pと同様に細胞増殖を誘導するが、 $\beta$ NFのAhRを介さない作用が細胞増殖を抑制しているという仮説を示している。

今回の3D細胞塊において $\beta$ NF添加では細胞増殖が抑制されるという結果はShimbaらが報告した肺腺がん細胞A549の2D細胞への $\beta$ NF添加が細胞増殖を刺激するという報告



<sup>24)</sup>と相反する結果となり，生体外リガンドが細胞増殖へ与える影響は 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは異なることが明確となった．また，本実験においては 3D 細胞塊における細胞増殖を増強する効果はタバコに含まれる B[a]P でのみ確認できる結果となった．

## 第4章 3D細胞塊における薬物代謝酵素の発現誘導

### 1. 緒言

がん培養細胞を用いた研究ではこれまでに、組織から培養細胞化する際に薬物代謝酵素の発現レベルが低下することが報告されており<sup>15)</sup>、培養細胞を用いて薬剤の評価を行う研究では臨床研究での結果と異なることがしばしば問題とされてきた。薬剤を用いた研究だけでなく、放射線治療の影響を評価した際にも2D細胞と3D細胞塊では違いが表れることが報告されている<sup>43,44)</sup>。これまでに、肝臓がんでは3D細胞塊を構築することで薬物代謝酵素や転写調節因子の遺伝子発現レベルが上昇することが報告されている<sup>45)</sup>。3D細胞塊を用いた研究では、薬物代謝酵素の発現がヒトがん組織レベルに近いこと、また、2D細胞では失われた細胞間接着の回復が確認され、ヒトがん組織に類似していることが報告されている<sup>46)</sup>。これまでの研究結果より、外来性のAhRリガンドによる細胞増殖への影響は2D細胞と3D細胞塊とでは異なることが明らかとなったが、AhRは転写調節因子として機能していることから、この差異はリガンドが結合したAhRが細胞増殖に関与する遺伝子の転写調節が2D細胞と3D細胞塊とで異なっているからではないかと私は推測した。

薬物代謝動態学分野では、肝臓がん細胞において、2D細胞と3D細胞塊とではAhRの転写調節ターゲットとなる薬物代謝酵素遺伝子の発現パターンが異なることを明らかにしている<sup>16)</sup>。しかし、肺がん細胞においてはAhRの転写調節パターンが2D細胞と3D細胞塊とで異なることは証明されていない。リガンド/AhRは薬物代謝酵素、CYP1 familyの転写調節因子としての作用がよく知られており、リガンド/AhRの転写調節解析においては、CYP1 familyの発現は明確な指標となる。まず、私は肺がん細胞において、CYP1 familyの発現を指標として、実際にB[a]P/AhRの転写調節のターゲットが2D細胞と3D細胞塊で異なるかどうかを解析した。

## 2. 材料および実験方法

### 2-1. 培養細胞および試薬

A549（ヒト肺線がん細胞, ATCC No.: CCL-185）を, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose: 4.5 g/LD-glucose; Gibco, Grand Island, NY, USA) にて, H520, H1703（ヒト肺扁平上皮がん細胞, ATCC No.: HTB-182, CRL-5889）は Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Gibco, Grand Island, NY, USA) に 10% fetal bovine serum (Hyclone, south Logan, VT, USA, Lot AZM197211) および 1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Incorporated, USA) を添加したものをを用いて, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した.

2D 細胞は細胞濃度  $1.0 \times 10^5$  cells/mL になるように調節し 90-mm dish に播種した.

3D 細胞塊は, 1000 cells/spheroid となるように濃度調整し, 低吸着性の Prime Surface 96V Plate を用いて培養した (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) .

### 2-2. 試薬

Benzo[a]pyrene (B[a]P) は, dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒として 10 mM ストックを作製し, 培養液で最終濃度 10  $\mu$ M になるように濃度調節して使用した. DMSO の最終濃度は 0.05% になるように調節した.

### 2-3. RNA 抽出と定量的 RT-PCR

遺伝子の発現量を確認するため, 2D と 3D それぞれ培養開始 48 時間後にサンプリング

を行い, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベルを確認した. 全 RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) を使用して抽出した. 抽出した RNA を鋳型に PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Clontech, Japan) を用いて cDNA を合成し, 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) にて 遺伝子発現レベルを確認した.

プライマー配列は以下の通りである.

*AhR*: Forward 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'

Revers 5'-ATACCCAAGAAGGAAGGCTGGA-3'.

*CYP1A1*: Forward 5'-CACCATCCCCCACAGCAC-3'

Reverse 5'-ACAAAGACACAACGCCCTT-3'

*CYP1A2*: Forward 5'-CAATCAGGTGGTGGTGTGTCAG-3'

Reverse 5'-GCTCCTGGACTGTTTTCTGC-3'

*CYP1B1*: Forward 5'-CGGCTGGATTTGGAAGAAACGTA-3'

Reverse 5'-TGATCCAATTCTGCCTGCACT-3'

*β-actin*: Forward 5'-ACATCACCTACGCCAGTCGC-3'

Revers 5'-TCTATGCCGCTTGGAAGGAT-3'.

#### 2-4. RNA 干渉法 (RNAi)

RNA 干渉法 (RNAi) は 肺がん細胞株における *AhR* をノックダウンするために行った. ヒト *AhR* mRNA (HSS100336; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) をターゲットとしているものを購入した.

siRNA の配列 : 5'-CCUUUAAUGGAGAGGUGCUUCAU-3'

5'-AUAUGAAGCACCUCUCCAUAAAAGG-3'

ネガティブコントロールとしてコントロール siRNA (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, SIC001-10; Sigma-Aldrich, Merck KGaA) を使用した。肺癌細胞株へのトランスフェクションは Lipofectamine™ RNAi MAX reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて 1 サンプル当たり 8 $\mu$ L (全量 6ml/ディッシュ) 使用した。3 種類の細胞株の 2D 細胞と 3D 細胞塊共に siRNA の最終濃度が 10 nM siRNA となるようにした。2D 細胞は、試薬類を 60-mm ディッシュ上で混合後 15 分間室温静置し、全量 3ml になるように濃度調整した細胞を加えて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。

3D 細胞は、試薬類を 15ml チューブ内で混合した後 15 分間室温静置し、全量 12ml になるように濃度調整した細胞を加え、低吸着性の Prime Surface 96V Plate (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を用いて 1well あたり 1000 cells になるように播種し培養した。

## 2-5. 統計解析

独立した 3 回のサンプリングから定量的 PCR を行った。得られた結果より *t* 検定を用いて、2D 細胞対 3D 細胞塊、コントロール (Control siRNA 処理または DMSO 添加サンプル) 対 *AhR* siRNA 処理または B[a]P 添加サンプルで検定を行った。  $p < 0.05$  を統計的に有意な結果であるとした。

## 3. 結果

### 3-1. 3D 細胞塊では 2D 細胞より薬物代謝酵素の発現レベルが上昇する

今回は肺で発現誘導される薬物代謝酵素である *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* とこれらの転

写調節因子である *AhR* の発現を測定した。使用した全細胞株 A549, H520, H1703 で 2D 細胞よりも 3D 細胞塊で *CYP1A1*, *CYP1B1* の発現レベルが上昇することがわかった。また, H1703 を除く 3D 細胞塊における *CYP1A2* の発現レベルも 2D 細胞における発現レベルより高かった (図 11)。

一方, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の転写調節因子である *AhR* の発現レベルは 2D 細胞と 3D 細胞塊では変動がなかった (図 11)。

これまでに肝臓がん細胞で 3D 細胞塊を構築すると 2D 細胞に比べて薬物代謝酵素の発現レベルや転写調節因子の発現が上昇するということが報告されており<sup>45)</sup>, 肺がん細胞においても同様に 2D 細胞より 3D 細胞塊で薬物代謝酵素発現レベルが高いという結果であったが, 一方で, 転写調節因子である *AhR* の発現レベルには変動がみられなかった。

### 3-2. 2D 細胞と 3D 細胞塊では CYP の発現調節経路が異なる

2D 培養時より 3D 細胞塊で *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現が上昇することが明らかとなったが, この薬物代謝酵素の発現には *AhR* が関与しているかどうかを明らかにする目的で, *AhR* をノックダウンした細胞を用いてそれぞれ遺伝子発現を測定した。

*AhR* ノックダウンによる *AhR* の発現レベルは, コントロール siRNA 処理群と比較して 2D 細胞と 3D 細胞塊共に有意に抑制されていることを確認した (図 12A)。

2D 細胞では, 使用した全細胞株において *AhR* をノックダウンすることにより *CYP1A1* の発現が抑制された。*CYP1A2*, *CYP1B1* の発現も同様に *AhR* をノックダウンすることで抑制されたことから, 2D 細胞における *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現調節には *AhR* が関与していることが明らかとなった (図 12B)。

一方, 3D 細胞塊では *AhR* をノックダウンした細胞の遺伝子変動には細胞間で違いがみられた。A549 においては *CYP1A1* の発現は減少傾向にあるものの, *CYP1A2* の発現は抑

制されず, H1703 では *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現レベルは抑制されなかった. 一方で H520 では *AhR* をノックダウンすることにより 2D 培養時と同様に *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現が抑制された. *CYP1B1* の発現に関しては, 使用した全細胞株で *AhR* をノックダウンすることにより抑制される結果になった (図 12C).

以上より, 肺がん 3D 細胞塊では H520 を除く A549, H1703 細胞株で *AhR* が *CYP1A1*, *CYP1A2* の遺伝子調節には関与せず, 主に *CYP1B1* の発現調節に関与していることが明らかになった. H520 では, 2D 細胞と同様に *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現は *AhR* によって制御されていることが明らかになった.

### 3-3. B[a]P 添加による遺伝子発現変動

B[a]P は, 肺の発がん誘導の際に *AhR* を介して *CYP1A1* の発現を誘導することが明らかになっているが<sup>10</sup>, 本研究の結果より, 3D 細胞塊では H520 を除いた A549 と H1703 で *CYP1A1*, *CYP1A2* の転写調節には *AhR* が関与しておらず, 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは *AhR* が転写調節している遺伝子に違いがあることが示唆された. 以上の結果より, B[a]P 添加による *AhR* を介した遺伝子発現誘導パターンも 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは異なるのではないかと私は予測し, B[a]P 添加による薬物代謝酵素の発現について検討した.

まず, B[a]P を添加しても, 2D 細胞, 3D 細胞塊共に *AhR* の発現レベルはコントロール (DMSO 添加サンプルを以下コントロールと表記する) と比較して差は見られなかった (図 13A). 次に, 2D 細胞では, 使用した全細胞株の A549, H520, H1703 で, これまでの知見と同様に B[a]P 添加によってコントロールとの間で有意に *CYP1A1* の発現レベルが上昇した. *CYP1A2*, *CYP1B1* も同様に B[a]P 添加により, コントロールと比較して有意に発現レベルが上昇し, 遺伝子発現が誘導されていることを確認した (図 13B).

3D 細胞塊では, H520 を除く A549, H1703 においては B[a]P を添加しても *CYP1A1*,

*CYP1A2* の発現レベルにはコントロールと比較して有意な差は見られなかった。H520 においては、B[a]P 添加により *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現レベルが有意に上昇していた。また、*CYP1B1* は全細胞株で B[a]P 添加によりコントロールと比較して発現レベルの有意な上昇がみられた (図 14C)。以上より、2D 細胞とは異なり、3D 細胞塊では H520 を除いて、B[a]P は *CYP1A1* と *CYP1A2* の転写誘導はせず、*CYP1B1* のみ発現誘導することが明らかになった。

この B[a]P 添加による遺伝子発現の誘導が *AhR* を介しているかどうかについて、*AhR* をノックダウンすることで検討した。

#### 3-4. B[a]P 添加による遺伝子の発現誘導は *AhR* を介している

B[a]P 添加により、2D 細胞では全細胞株で *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現誘導が確認され、3D 細胞塊では A549, H520, H1703 において B[a]P 添加により *CYP1B1* の発現誘導が見られた。H520 では *CYP1A1*, *CYP1A2* についても 3D 細胞塊で B[a]P 添加による発現誘導が見られたが、これらの B[a]P 添加による CYP の発現誘導には *AhR* が関与しているかどうか、*AhR* をノックダウンした細胞へ B[a]P を添加することで確認した。2D 細胞と 3D 細胞塊における *AhR* の発現の抑制効率は図 14A に示した通りであり、どの細胞においてもコントロール siRNA 処理サンプルと比較して有意に *AhR* は抑制されていることを確認した。

2D 細胞では、*AhR* をノックダウンすることにより、全細胞株で B[a]P を添加しても *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベルの誘導は見られなかった (図 14B)。この結果より、2D 細胞で B[a]P 添加による *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現誘導は *AhR* を介していることが明らかになった。

3D 細胞塊においても、B[a]P 添加による *CYP1B1* の発現誘導は、*AhR* をノックダウン



した全細胞株で、コントロール siRNA 処理サンプルと比較して遺伝子発現は誘導されず、発現レベルは有意に低下した。H520 でも、B[a]P 添加によって見られた *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現上昇は、*AhR* をノックダウンすることで見られなくなり、コントロール siRNA 処理のサンプルと比較して有意に遺伝子発現レベルは低下していた (図 14C)。以上より、3D 細胞塊においても B[a]P 添加によって発現誘導がみられる遺伝子群の調節は *AhR* を介していることが明らかになった。

#### 4. 考察

組織から採取した細胞を培養細胞化すると薬物代謝酵素の発現レベルが低下するという報告があるが<sup>15)</sup>、肝臓がん細胞では 3D 細胞塊を構築することで薬物代謝酵素の発現が上昇することが報告されている<sup>45)</sup>。今回の結果より、肺がんにおいても、3D 細胞塊を構築することで 2D 培養時よりも *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の遺伝子発現レベルが上昇することが明らかになった (図 11)。肝臓がん細胞の 3D 細胞塊では、薬物代謝酵素の転写調節因子の発現が上昇するため、それに伴って薬物代謝酵素の発現も上昇するのではないかと考えられている<sup>45)</sup>。

しかし、肺がん細胞での 3D 細胞塊においては *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の転写調節因子である *AhR* の発現レベルは 2D 細胞と比較しても変動はみられなかった (図 11)。肺がん細胞において、*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現調節には *AhR* が核移行することが重要であるということが報告されていることから<sup>47,48)</sup>、肺がん細胞では、3D 細胞塊を構築することで *AhR* の核移行が促進されているのではないかと推測される。

*AhR* はリガンドが結合することで核移行が誘導されると報告されているため、リガンドの存在について考えなくてはならないが、本実験結果 (3-1, 3-2) ではリガンド処理をしていないため、内因性の *AhR* リガンドの存在が示唆された。*AhR* の内因性リガンドはトリプ

トファンの代謝過程で生じるキヌレニンが同定されており<sup>5)</sup>, がん細胞内においても産生されることが報告されている<sup>33)</sup>. 3D 細胞塊における AhR の遺伝子制御を明らかにするために, 肺がん細胞における内因性 AhR リガンドを特定することが今後の課題である.

本研究結果でこれまでの報告と異なった A549 と H1703 の AhR を介した遺伝子制御のまとめを図 15 に示す. AhR のリガンドを加えていない場合, 2D 細胞においてはこれまでの知見通り, 肺がん細胞内でも *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現に *AhR* が関与しているということが確認できた. しかし, 3D 細胞塊を構築すると *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現調節には *AhR* は関与せず, *CYP1B1* の発現調節のみ *AhR* によって制御される. 以上より, 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは *AhR* が制御する遺伝子が異なることが示唆された. まとめには示さないものの, H520 においては, 2D 細胞と 3D 細胞塊ともに *AhR* によって *CYP1B1* のみでなく, *CYP1A1*, *CYP1A2* も発現が調節されており, 同じ肺がん細胞でも培養細胞株が異なると遺伝子制御が異なることが明らかとなった.

さらに, 2D 細胞と 3D 細胞ではともに *CYP1B1* の発現誘導に AhR が関与していることが明らかになったことから, 肺がん細胞の定常的な増殖には *CYP1B1* が関わっているのではないかと推測される. *CYP1B1* は正常組織では発現は見られないものの, 肺, 食道, 乳, 大腸, 皮膚, リンパ節, 脳, 精巣がん細胞において発現誘導が確認されることが報告されており<sup>48)</sup>, *AhR* が発現を調節しているといわれる薬物代謝酵素の一つである. *CYP1B1* の機能の一つに, がん細胞の酸化ストレスへの関与を介してがん細胞の成長を促進していることが示唆されており, 肺がん細胞の増殖促進において *CYP1B1* が関与している可能性が報告されている<sup>49)</sup>.

B[a]P 添加による A549 と H1703 の遺伝子変動結果のまとめを図 15 に示す. 本研究では 2D 細胞と 3D 細胞塊において B[a]P 添加による *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベルを観察したが, 2D 細胞ではこれまでの知見通り B[a]P が *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現を誘導していることが明らかとなった (図 13B). 一方で, 3D 細胞塊を構築すると,

A549, H1703 では *CYP1A1*, *CYP1A2* の発現誘導は見られず, *CYP1B1* の発現誘導のみ観察された (図 13C). H520 においては他の 2 種と異なり, B[a]P 添加により 3D 細胞塊でも 2D 細胞と同様に *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現誘導が確認された.

$\beta$ NF 添加時の細胞死誘導の結果と同様に A549, H1703 と H520 とでは同じ肺がん由来の細胞であっても, B[a]P 添加による遺伝子発現パターンが異なることが明らかとなった. H520 は H1703 と同じ扁平上皮細胞肺がん細胞株として分類されるが, H520 においては p53 発現レベルが他の肺がん細胞のレベルよりも低いという報告があり<sup>50)</sup>, この違いが薬物代謝酵素遺伝子の発現パターンの違いに影響を与えているのではないかと推測される.

以上より, 細胞増殖に関与する遺伝子は現段階では不明であるが, 2D 細胞と 3D 細胞塊とで薬物代謝酵素の発現パターンが異なることが明らかになったことから, B[a]P によって発現誘導される細胞増殖関連遺伝子が 2D 細胞と 3D 細胞塊とで異なっている可能性がある. 今後は, 網羅的解析によって B[a]P/AhR 複合体によって調節される増殖関連遺伝子の特定と 2D 細胞と 3D 細胞塊における発現パターンの違いを明らかにすることが課題である. これまでに, AhR が直接的に発現調節しており, 細胞増殖に関与している遺伝子として *CYP1B1*<sup>49)</sup>, 線維芽細胞成長因子 9 (FGF-9)<sup>51)</sup>, E2F1<sup>24)</sup> が報告されており, これらの遺伝子の関与から検討していく予定である.

## 第5章 総合考察および結論

本研究では、AhR が肺がん細胞の細胞増殖に関与しているという仮説をたて、発がん誘導への関与は報告されているがヒト肺がん細胞内における作用は明確ではない AhR リガンドである benzo[a]pyrene (B[a]P) と  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) が肺がん細胞の細胞増殖へどのような影響を与えるのかを明らかにすることが目的である。実験を進めるにあたり、私は 2D 培養と 3D 培養の両培養系を用いて研究を行った。本研究ではヒト肺がん細胞株 A549 (ヒト肺腺がん由来)、H520 と H1703 (ヒト肺扁平上皮がん由来) を使用した。

本研究結果のまとめと今後の課題について図 16 にまとめた。まず、AhR をノックダウンした細胞の細胞数変化の結果から、2D 細胞と 3D 細胞塊ともに細胞数が減少することが明らかになり、AhR は肺がん細胞の増殖に重要な分子であることが明らかになり、内因性 AhR リガンドの存在が示唆された。そして、B[a]P は 3D 細胞塊でのみ細胞増殖を増強させることが明らかになり、2D 細胞とは AhR リガンドに対する効果が異なることを明らかにした。B[a]P が 3D 細胞塊における細胞増殖を増強させる効果は AhR をノックダウンした細胞では確認されなかったため、B[a]P の細胞増殖を増強させる効果は AhR を介しているということが結論である。

3D 細胞塊は細胞間接着の回復や低酸素・低グルコースによるストレスにさらされるといふ点で生体内のがん細胞に類似していることが近年明らかとなっており、3D 細胞塊のサイズが 200  $\mu$ m ほどであることから、生体内の微小ながんに類似していると予想される。以上のことから、本結果が *in vivo* の肺がん細胞に当てはまるとすると、肺がん細胞が体内にある場合、喫煙者の肺がん細胞は、非喫煙者の肺がん細胞よりも増殖が速いと予想される。増殖が速ければ、がん細胞塊の成長も速く、血管新生などがんの進行も速くなるのではないかと考えられ、この影響が序論で述べた、喫煙患者は禁煙患者と比較して予後不良である結果の生物学メカニズムの一つではないかと推測される。

$\beta$ NF を添加して細胞増殖への影響を検討した結果からは、 $\beta$ NF は B[a]P の 3D 細胞塊の

細胞数を増加させる効果とは逆に 3D 細胞塊の細胞数を減少させた。以上のことから AhR のリガンドでも化合物が異なると細胞増殖への影響が異なることが明らかになった。さらに、この結果はこれまでに報告されていた A549 の 2D 細胞における  $\beta$ NF が細胞増殖を増強するという結果とは異なった。現時点では  $\beta$ NF 添加による細胞数減少の効果が AhR を介しているかどうかに関しては明らかになっていないため、まずは  $\beta$ NF の影響が AhR を介しているかどうかを明らかにすることが今後の課題である。

2D 細胞と 3D 細胞塊における AhR リガンドの細胞増殖への影響が異なった原因として、私は AhR が転写調節因子であることから細胞増殖関連遺伝子の発現調節が関与しているのではないかと推測した。薬物代謝動態学分野では肝臓がんにおいて AhR の転写調節パターンが 2D 細胞と 3D 細胞塊とでは異なることを明らかにしてきたが、肺癌細胞においては AhR の転写調節パターンが異なることは証明されていない。まずは、実際に AhR の転写調節パターンが異なっているかどうかを、AhR の転写調節機能の解析で重要な指標とされる薬物代謝酵素遺伝子で検討した。遺伝子発現パターンの解析結果より、2D 細胞と 3D 細胞塊では AhR の転写調節ターゲットが異なることが示唆された。現段階では、リガンド / AhR 複合体が発現制御している細胞増殖関連遺伝子は不明であるが、2D 細胞と 3D 細胞塊とでは AhR を介した転写調節には違いがあることが明らかになったことから、リガンドによる 2D 細胞と 3D 細胞塊における細胞増殖への影響の差異は遺伝子転写調節の差異が影響しているのではないかと考えられる。

今後はマイクロアレイ解析等の網羅的解析により、B[a]P と  $\beta$ NF が転写調節している増殖関連遺伝子の特定、そして 2D 細胞と 3D 細胞塊とでの発現パターンの違いを明らかにすることが課題である。そして、本研究より内因性リガンドの存在が示唆されたため、メタボローム解析等で AhR の内因性リガンドを特定することが課題である。本研究をさらに発展させることは、肺癌細胞の再発メカニズム、進展メカニズムの解明に有用な知見を与えると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始、丁寧かつ熱心にご指導とご助言を賜りました岩手医科大学薬学部薬物代謝動態学分野 助教 寺島潤 先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、実験結果および研究方針等について多大なるご助言を賜りました、岩手医科大学薬学部臨床医化学分野 教授 那谷耕司 先生、情報薬科学分野 教授 西谷直之 先生、薬学教育学分野 奈良場博昭 先生、薬物代謝動態学分野 教授 小澤正吾 先生、准教授 幅野 渉 先生、に深く感謝いたします。そして、本研究の实地にあたりご協力とご支援をいただきました神馬慶子氏、谷地真亜子氏、博多修子博士に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 国立がん研究センター がん情報サービス：最新がん統計  
  
[Available from: https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
  
- 2) Nebert DW, Goujon FM, Gielen JE. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse. *Nat New Biol.* 236, 107-110, 1972.
  
- 3) Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22, 517-554, 1982.
  
- 4) Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact.* 141, 3-24, 2002.
  
- 5) Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 309-334, 2003.
  
- 6) Esser C, Rannug A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev.* 67, 259-279, 2015.
  
- 7) Marlowe JL, Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and

- tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 96, 1174-1184, 2005.
- 8) Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol.* 14, 767-790, 2001.
  - 9) Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 686, 12-27, discussion 27-28, 1993.
  - 10) Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 21, 7435-7451, 2002.
  - 11) Parsons A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ.* 340, b5569, 2010. doi: 10.1136/bmj.b5569.
  - 12) Lin P, Chang H, Tsai WT, Wu MH, Liao YS, Chen JT, Su JM. Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas. *Toxicol Pathol.* 31, 22-30, 2003.
  - 13) Su JM, Lin P, Chang H. Prognostic value of nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 33, 3953-3961, 2013.
  - 14) Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on



tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 163, 94-108, 2016.

doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

- 15) Horiuchi S, Ishida S, Hongo T, Ishikawa Y, Miyajima A, Sawada J, Ohno Y, Nakazawa K, Ozawa S. Global gene expression changes including drug metabolism and disposition induced by three-dimensional culture of HepG2 cells-Involvement of microtubules. *Biochem Biophys Res Commun.* 378, 558-562, 2009. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.088.
- 16) Terashima J, Goto S, Hattori H, Hoshi S, Ushirokawa M, Kudo K, Habano W, Ozawa S. CYP1A1 and CYP1A2 expression levels are differentially regulated in three-dimensional spheroids of liver cancer cells compared to two-dimensional monolayer cultures. *Drug Metab Pharmacokinet.* 30, 434-440, 2015  
doi:10.1016/j.dmpk.2015.10.001.
- 17) Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitan SJ, Teicher BA, Kerbel RS. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 3294-3298, 1993.
- 18) Fessart D, Begueret H, Delom F. Three-dimensional culture model to distinguish normal from malignant human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 42, 1345-1356, 2013. doi: 10.1183/09031936.00118812.
- 19) International Agency for Research on Cancer; IARC monographs the evaluation of

carcinogenic risks to humans.

Available from: <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>

- 20) Chen RJ, Siao SH, Hsu CH, Chang CY, Chang LW, Wu CH, Lin P, Wang YJ. TCDD promotes lung tumors via attenuation of apoptosis through activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways. *PLoS One.* 9, e99586, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0099586.
- 21) Mao C, Wang M, Qian B, Ouyang L, Shi Y, Liu N, Chen L, Xiao D, Wang X, Cao Y, Liu S, Tao Y, Liu W. Aryl hydrocarbon receptor activated by benzo (a) pyrene promotes SMARCA6 expression in NSCLC. *Am J Cancer Res.* 8, 1214-1227, 2018.
- 22) Yin J, Sheng B, Qiu Y, Yang K, Xiao W, Yang H. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Prolif.* 49, 554-560, 2016. doi: 10.1111/cpr.12282.
- 23) Tsay JJ, Tchou-Wong KM, Greenberg AK, Pass H, Rom WN. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res.* 33, 1247-1256, 2013.
- 24) Shimba S, Komiyama K, Moro I, Tezuka M. Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells. *J Biochem.* 132, 795-802, 2002.
- 25) Watabe Y, Nazuka N, Tezuka M, Shimba S. Aryl hydrocarbon receptor functions as a

- potent coactivator of E2F1-dependent transcription activity. *Biol Pharm Bull.* 33, 389-397, 2010.
- 26) Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 685, 624-640, 1993.
- 27) Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front Cell Dev Biol.* 4, 45, 2016. doi: 10.3389/fcell.2016.00045.
- 28) Dietrich C, Kaina B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis.* 31, 1319-1328, 2010.  
doi: 10.1093/carcin/bgq028.
- 29) Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A, Tan Z, Kerzee JK, Chang X, Strobeck M, Knudsen ES. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 27, 181-182, 171-7, 2002.
- 30) Gao Z, Bu Y, Liu X, Wang X, Zhang G, Wang E, Ding S, Liu Y, Shi R, Li Q, Fu J, Yu Z. TCDD promoted EMT of hFPECs via AhR, which involved the activation of EGFR/ERK signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 298, 48-55, 2016.  
doi:10.1016/j.taap.2016.03.005.
- 31) Vaziri C, Faller DV. A benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 272, 2762-2769, 1997.

- 32) Terashima J, Habano W, Gamou T, Ozawa S. Induction of CYP1 family members under low-glucose conditions requires AhR expression and occurs through the nuclear translocation of AhR. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26, 577-583, 2011. doi: 10.2133/dmpk.
- 33) Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 478, 197-203, 2011. doi: 10.1038/nature10491.
- 34) Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 185, 3190-3198, 2010. doi:10.4049/jimmunol.0903670.
- 35) Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48, 4776-4782, 1988.
- 36) Anderson LM and Priest LJ: Reduction in the transplacental carcinogenic effect of methylcholanthrene in mice by prior treatment with beta-naphthoflavone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 30, 431-446, 1980.
- 37) Wang C, Xu CX, Bu Y, et al.: Beta-naphthoflavone (DB06732) mediates estrogen

- receptor-positive breast cancer cell cycle arrest through AhR-dependent regulation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling. *Carcinogenesis*. 35, 703-713, 2014.
- 38) Xu GH, Ryoo IJ, Kim YH, Choo SJ, Yoo ID. Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*. *Arch Pharm Res*. 32, 275-282, 2009. doi: 10.1007/s12272-009-1233-y.
- 39) Cichon MA, Gainullin VG, Zhang Y, et al.: Growth of lung cancer cells in three-dimensional microenvironments reveals key features of tumor malignancy. *Integr Biol (Camb)*. 4, 440-448, 2012 doi: 10.1039/c1ib00090j.
- 40) Denison MS, Soshilov AA, He G, et al.: Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 124, 1-22, 2011.
- 41) Sugihara K, Okayama T, Kitamura S, et al.: Comparative study of aryl hydrocarbon receptor ligand activities of six chemicals in vitro and in vivo. *Arch Toxicol* 82, 5-11, 2008.
- 42) Volkov MS, Bolotina NA, Evteev VA, et al.: Ah-receptor-independent stimulation of hpatoma 27 culture cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry (Mosc)* 77, 201-207, 2012.
- 43) Castro MA, Schwartzmann G, Moreira JC. Intercellular contact-dependent survival of human A549, NCI-H596 and NCI-H520 non-small cell lung carcinoma cell lines.

- Braz J Med Biol Res. 34, 1007-101, 2001.
- 44) Kwok TT, Sutherland RM. The influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells. *Radiat Res.* 126, 52-57, 1991.
- 45) Kato R, Shigemoto K, Akiyama H, Ieda A, Ijiri Y, Hayashi T. Human hepatocarcinoma functional liver cell-4 cell line exhibits high expression of drug-metabolizing enzymes in three-dimensional culture. *Biol Pharm Bull.* 37, 1782-1787, 2014.
- 46) Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog.* 52, 167-182, 2013. doi: 10.1002/mc.21844.
- 47) Ikuta T, Tachibana T, Watanabe J, Yoshida M, Yoneda Y, Kawajiri K. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem.* 127, 503-509, 2000.
- 48) Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41, 297-316, 2001
- 49) Chang JT, Chang H, Chen PH, Lin SL, Lin P. Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 13, 38-45, 2007.

- 50) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*. 246, 491-494, 1989.
- 51) Wang CK, Chang H, Chen PH, Chang JT, Kuo YC, Ko JL, Lin P. Aryl hydrocarbon receptor activation and overexpression upregulated fibroblast growth factor-9 in human lung adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 125, 807-815, 2009.  
doi:10.1002/ijc.24348.

図 1

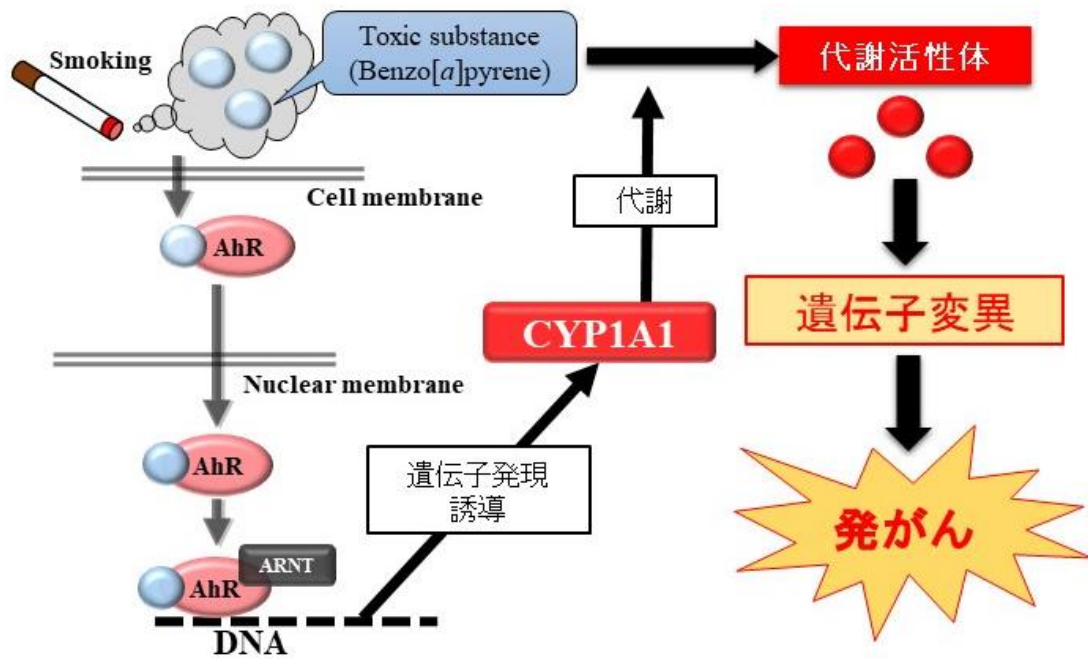


図 1. 肺の発がん誘導メカニズム.



図 2

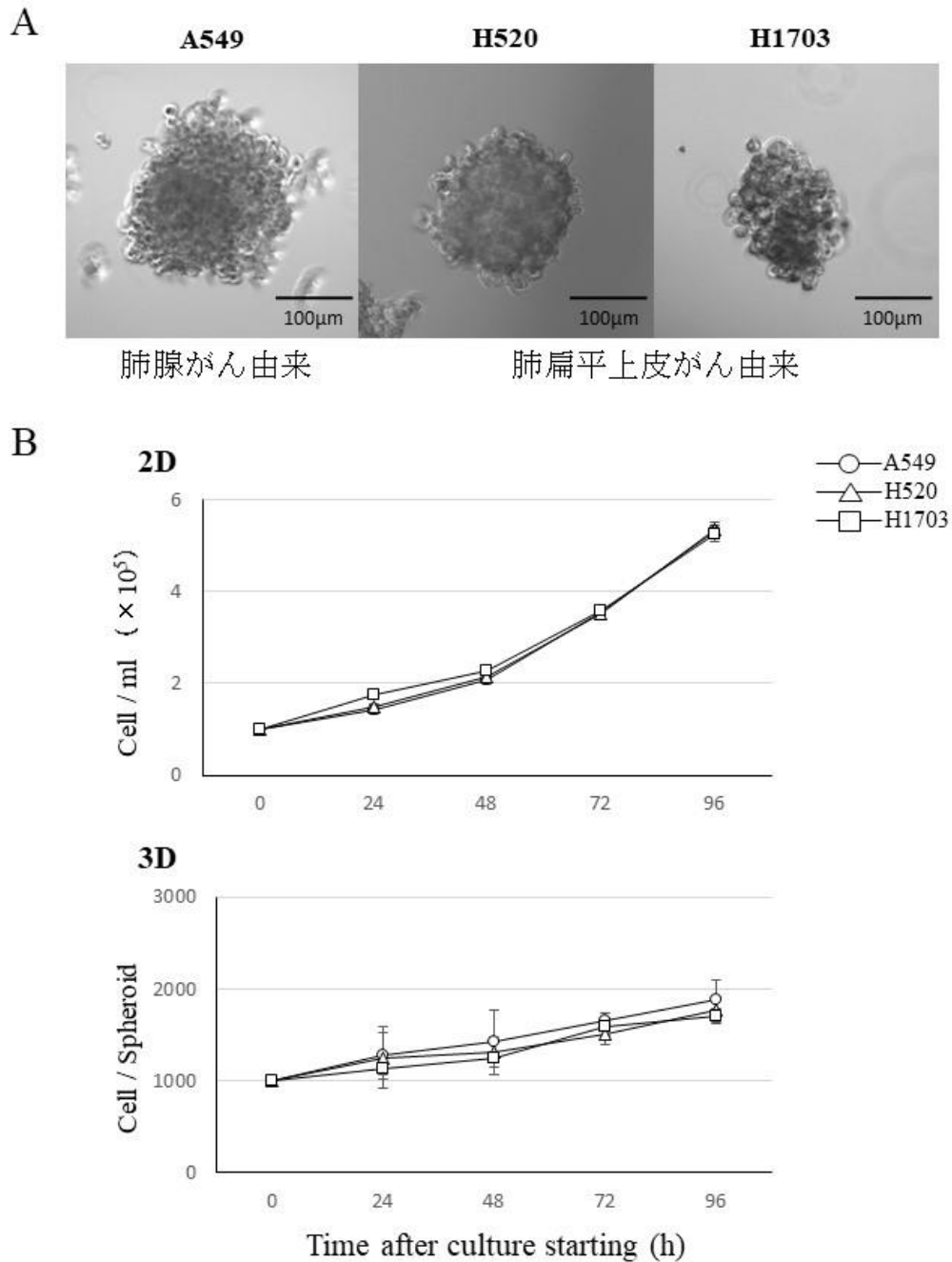


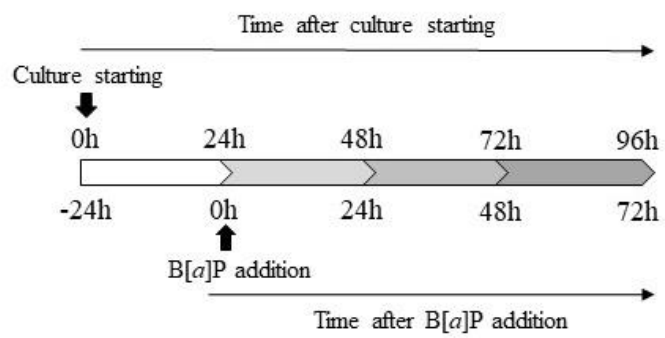
図 2. 3D 細胞塊の構築と 2D 細胞と 3D 細胞塊における細胞数変化の解析.

A : 3D 培養開始後 48 時間の A549, H520, H1703 の 3D 細胞塊. スケールバーは 100 µm.

B : 2D 細胞と 3D 細胞塊における細胞増殖. X 軸には培養開始後の経過時間, Y 軸は 2D 細胞では細胞濃度, 3D 細胞塊では細胞数/spheroid を示している. 独立した 3 回の実験結果より平均値を算出し, 平均±標準偏差 (SD) として示した.

☒ 3A

A



☒ 3B

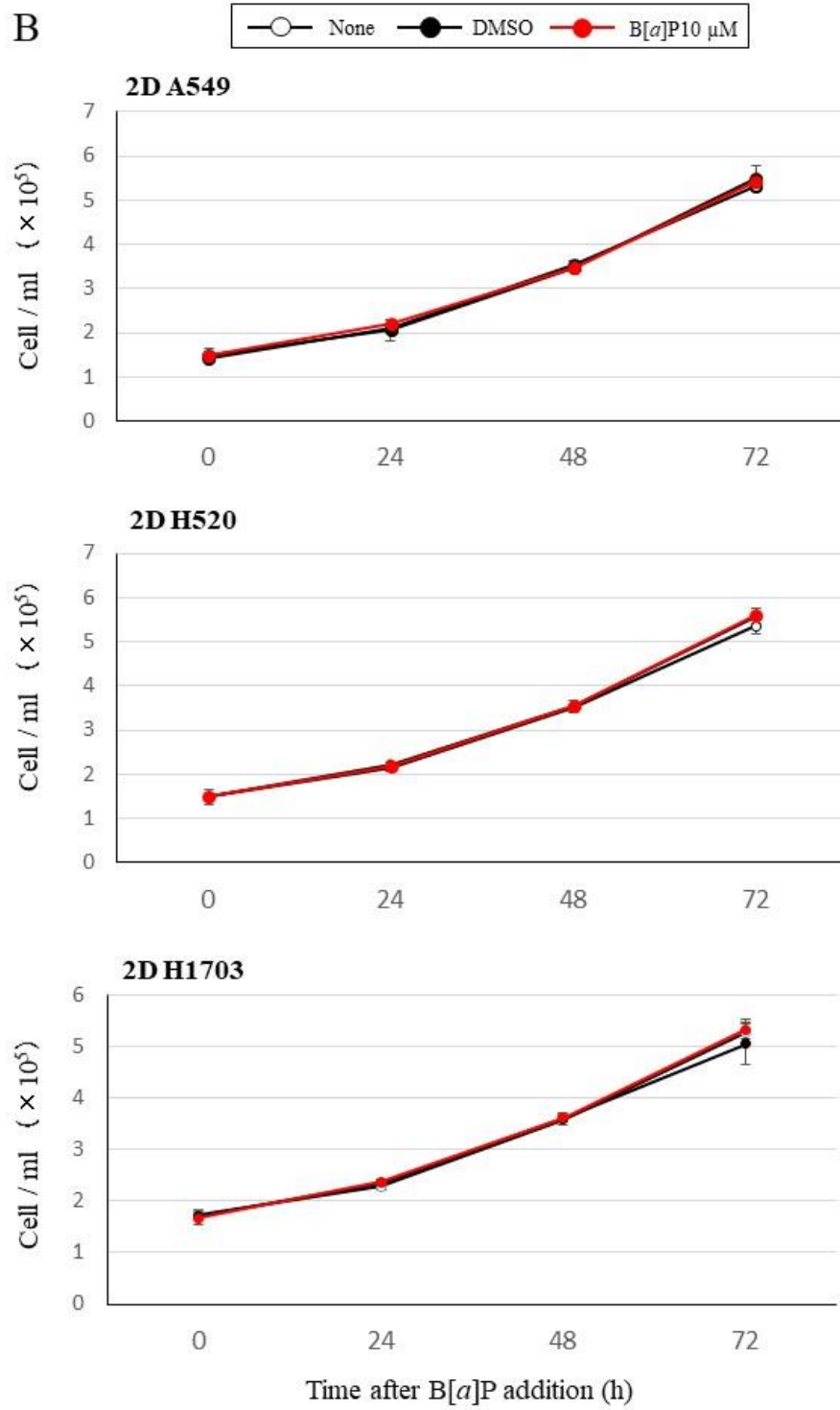


図 3C

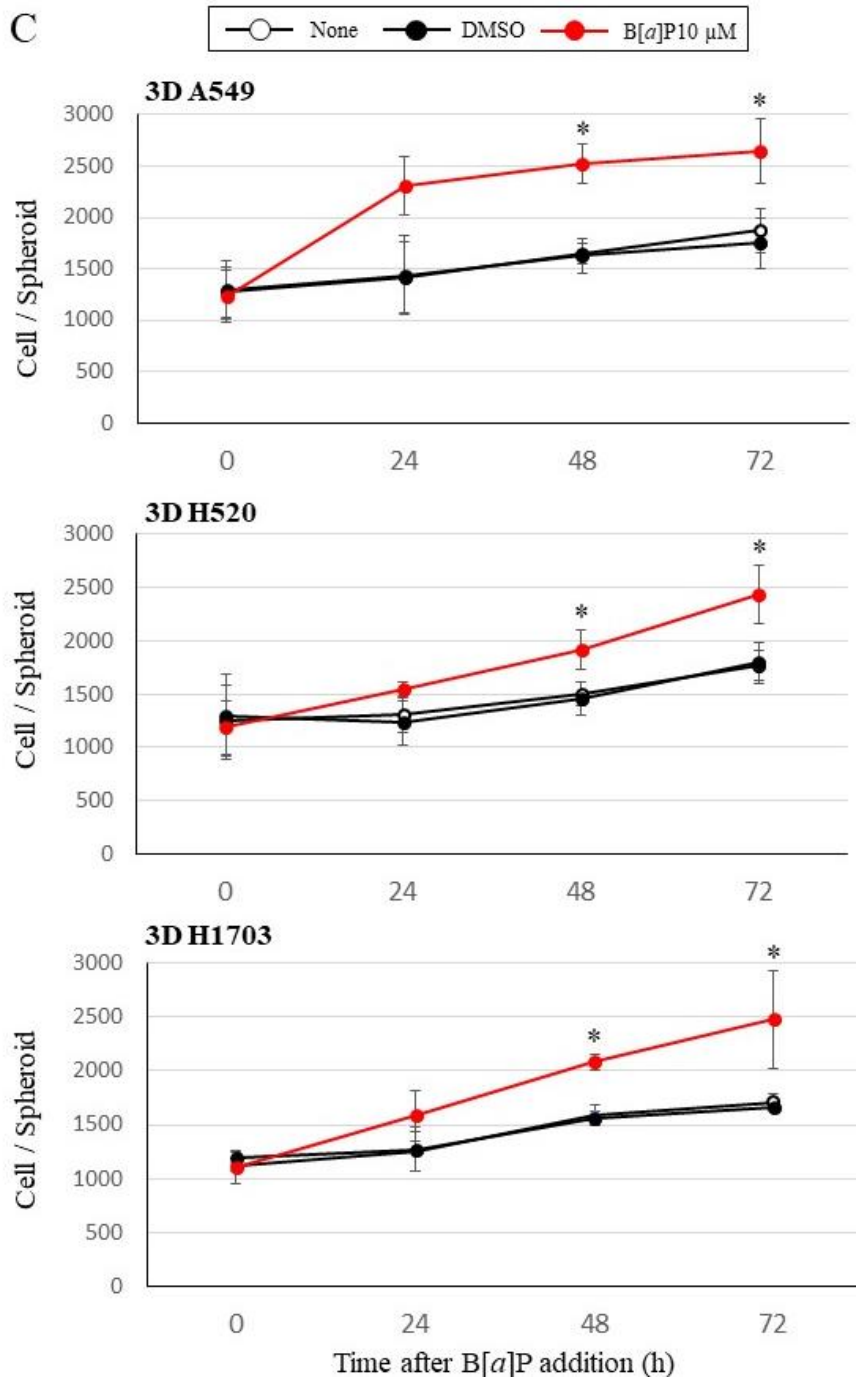


図 3. B[a]P が細胞増殖へ与える影響の検討。

A: B[a]P 添加による細胞培養スケジュール。2D 細胞, 3D 細胞塊共に培養開始 24 時間経過後に B[a]P (最終濃度 10 μM) を添加した。B: B[a]P 添加による 2D 細胞における細胞数変化を細胞濃度で示した。C: B[a]P 添加による 3D 細胞塊の細胞数変化を細胞数/spheroid で示した。B と C はそれぞれ 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均±標準偏差 (SD) として示した。得られたデータは *t* 検定を用いて DMSO 添加サンプルと B[a]P 添加サンプルの間で統計処理を行った。\**p*<0.05

☒ 4A

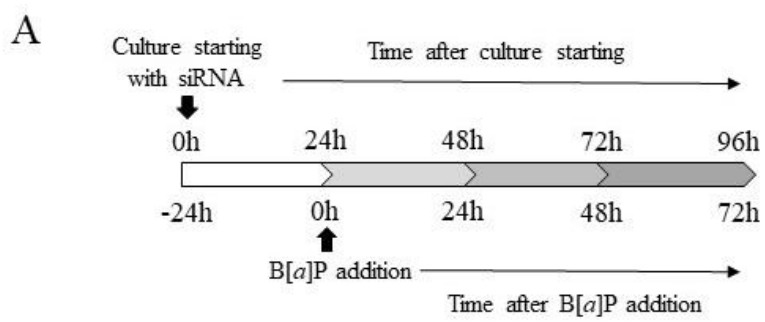


図 4B

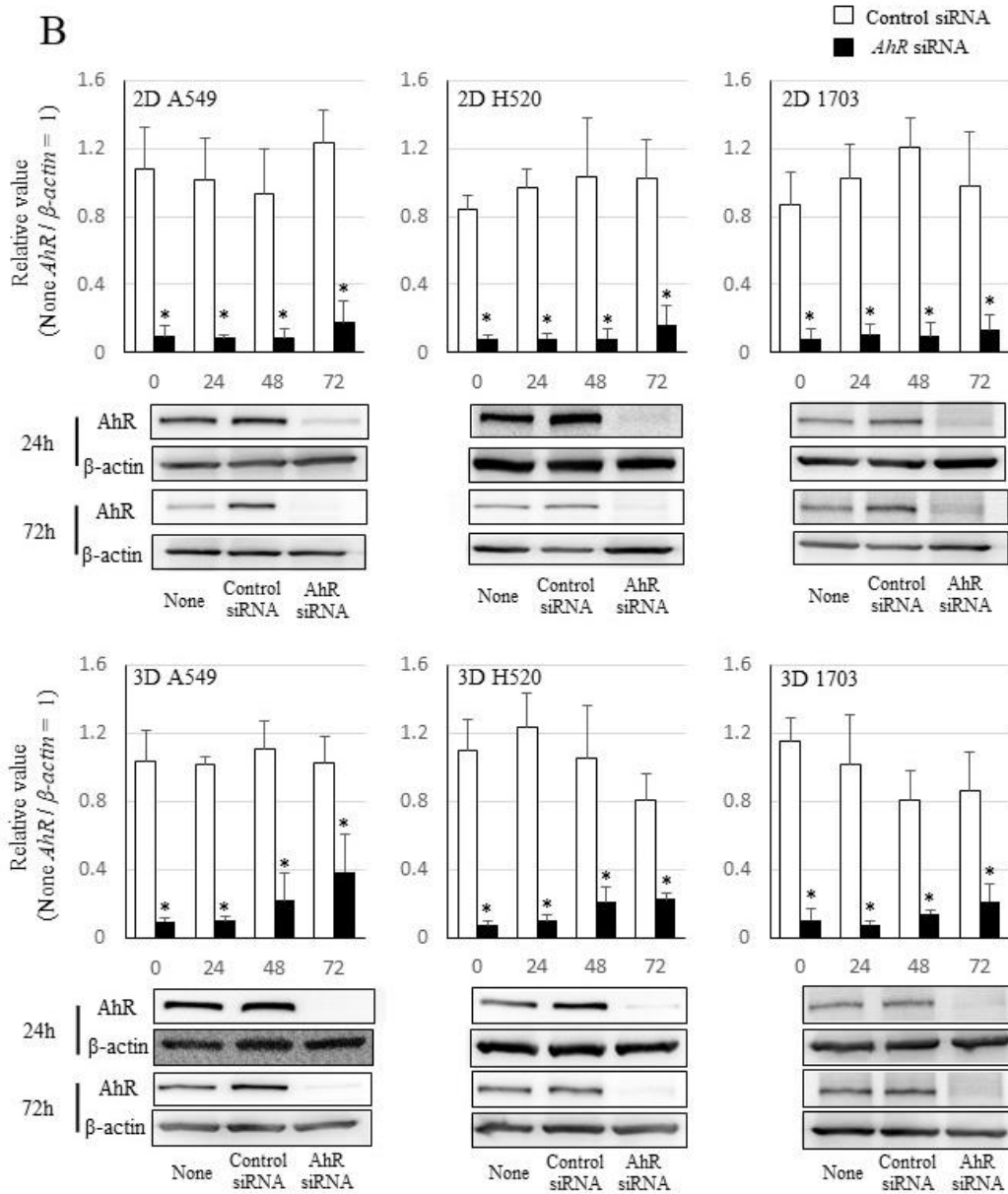


図 4. *AhR* ノックダウンによる *AhR* の発現抑制.

A: *AhR* 処理後 (最終 siRNA 濃度は 2D 細胞, 3D 細胞塊共に 10 nM) の B[a]P 添加の培養スケジュール. B: *AhR* ノックダウンによる *AhR* の遺伝子発現とタンパク発現量の変化. 遺伝子発現のグラフは X 軸に B[a]P 処理後経過時間を表記した. Y 軸は None (Lipofectamin 8  $\mu$ L のみ) の *AhR* 発現量 ( $\beta$ -actin で標準化) を 1 として遺伝子発現レベルを算出した. 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA と *AhR* siRNA の間で統計処理を行った. \**p* < 0.05

ウェスタンブロットは None (Lipofectamin 8  $\mu$ L のみ), Control siRNA (8  $\mu$ L Lipofectamin および 10 nM Control siRNA), *AhR* siRNA (8  $\mu$ L Lipofectamin および 10 nM *AhR* siRNA) を示す. トランスフェクション後 48 時間と 96 時間におけるサンプリングの結果であるが, 表記時間は B[a]P 添加後の経過時間に合わせて表記した.

図 4C

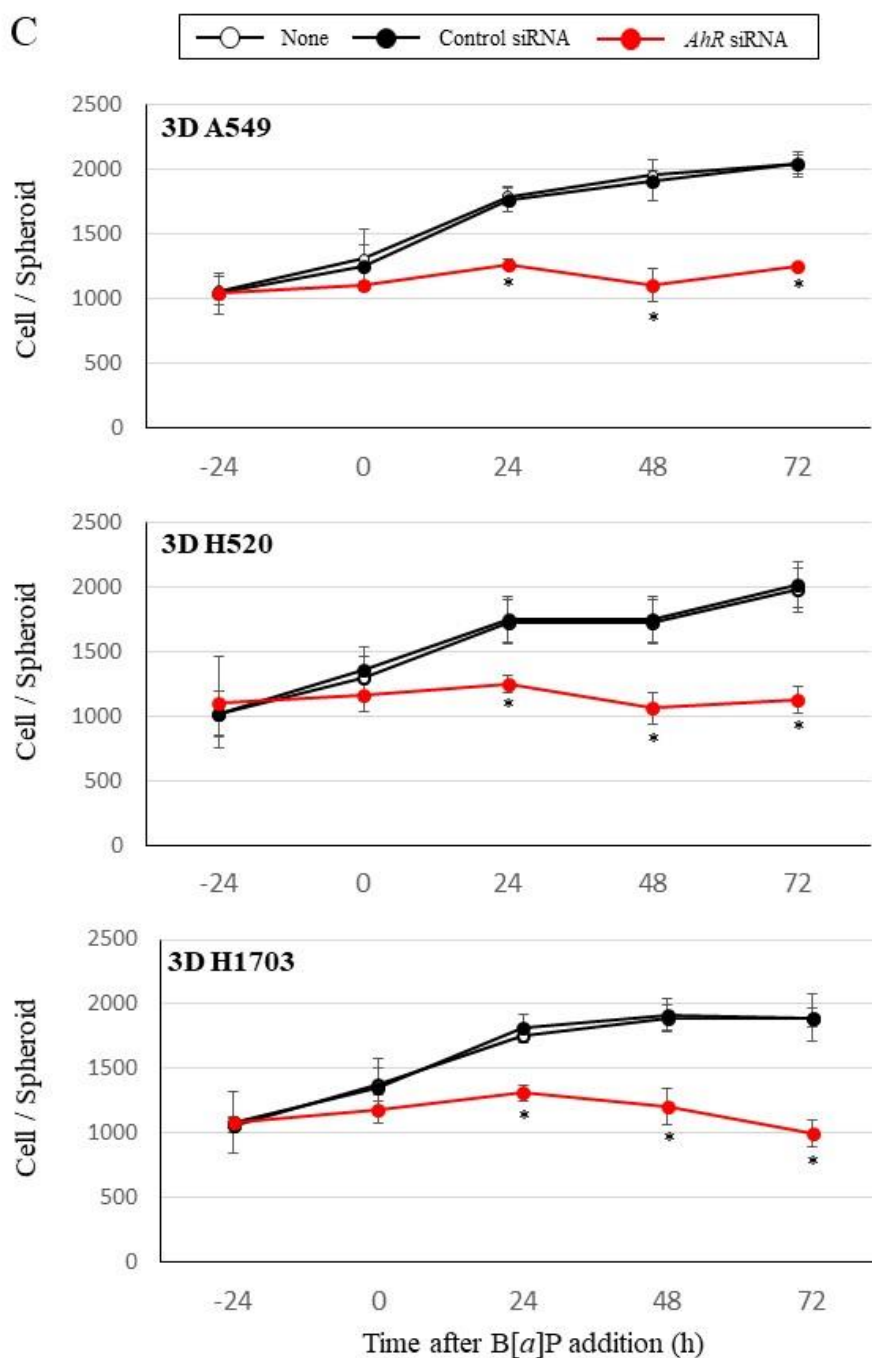
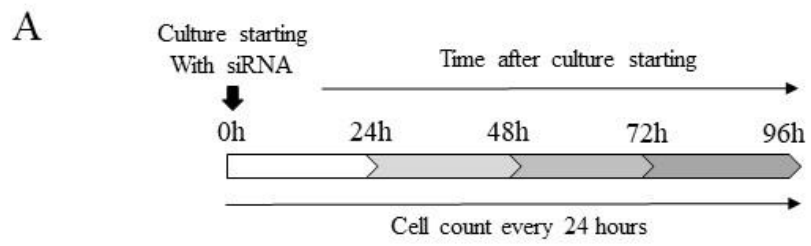


図 4C. *AhR* ノックダウンした細胞への B[a]P 添加による細胞数変化の解析.

*AhR* をノックダウン (siRNA 最終濃度 10 nM) した 3D 細胞塊に B[a]P を添加した際の細胞数変化. X 軸は B[a]P 添加後の経過時間を示し, Y 軸は細胞数/spheroid で示す. 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均値±標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA と *AhR* siRNA の間で統計処理を行った. \* $p < 0.05$

☒ 5A





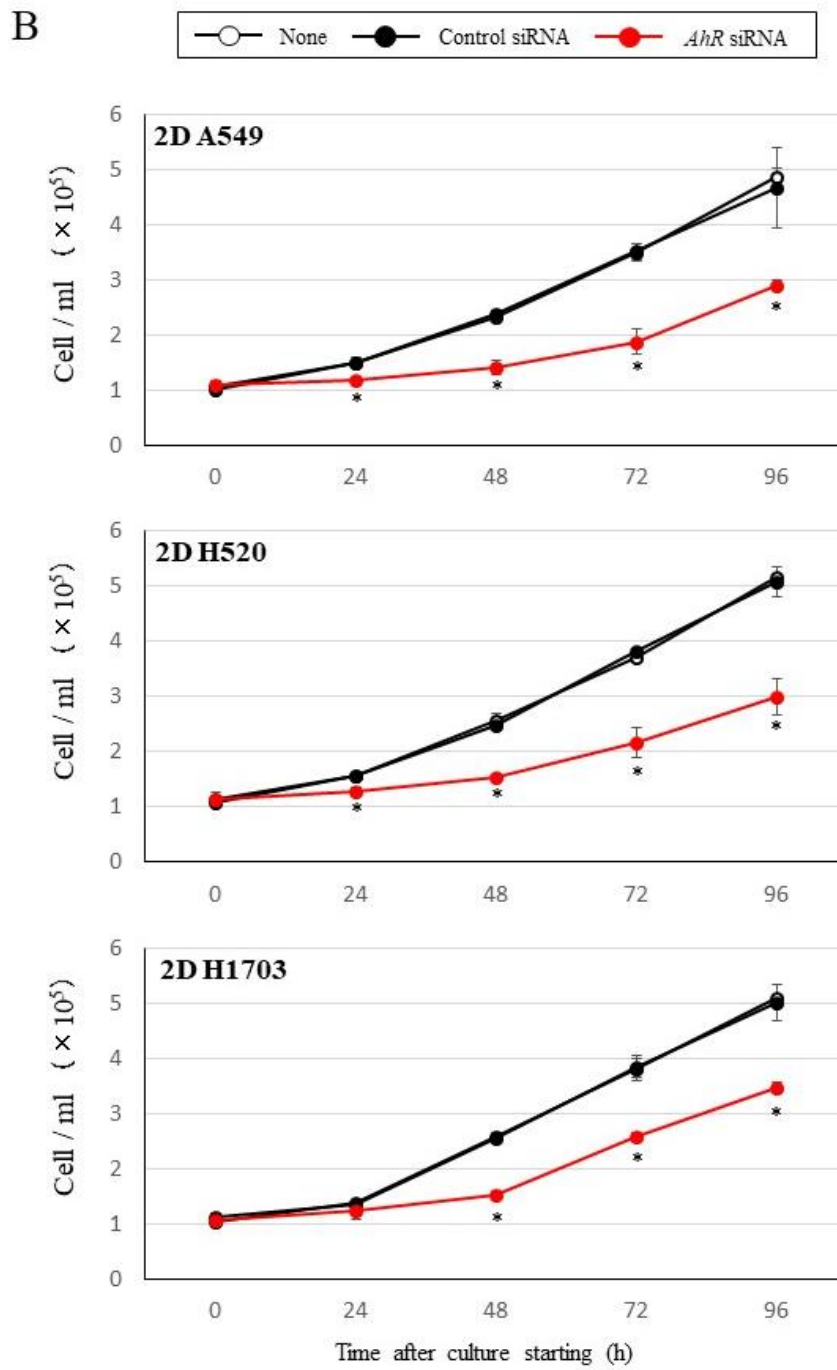


図 5C

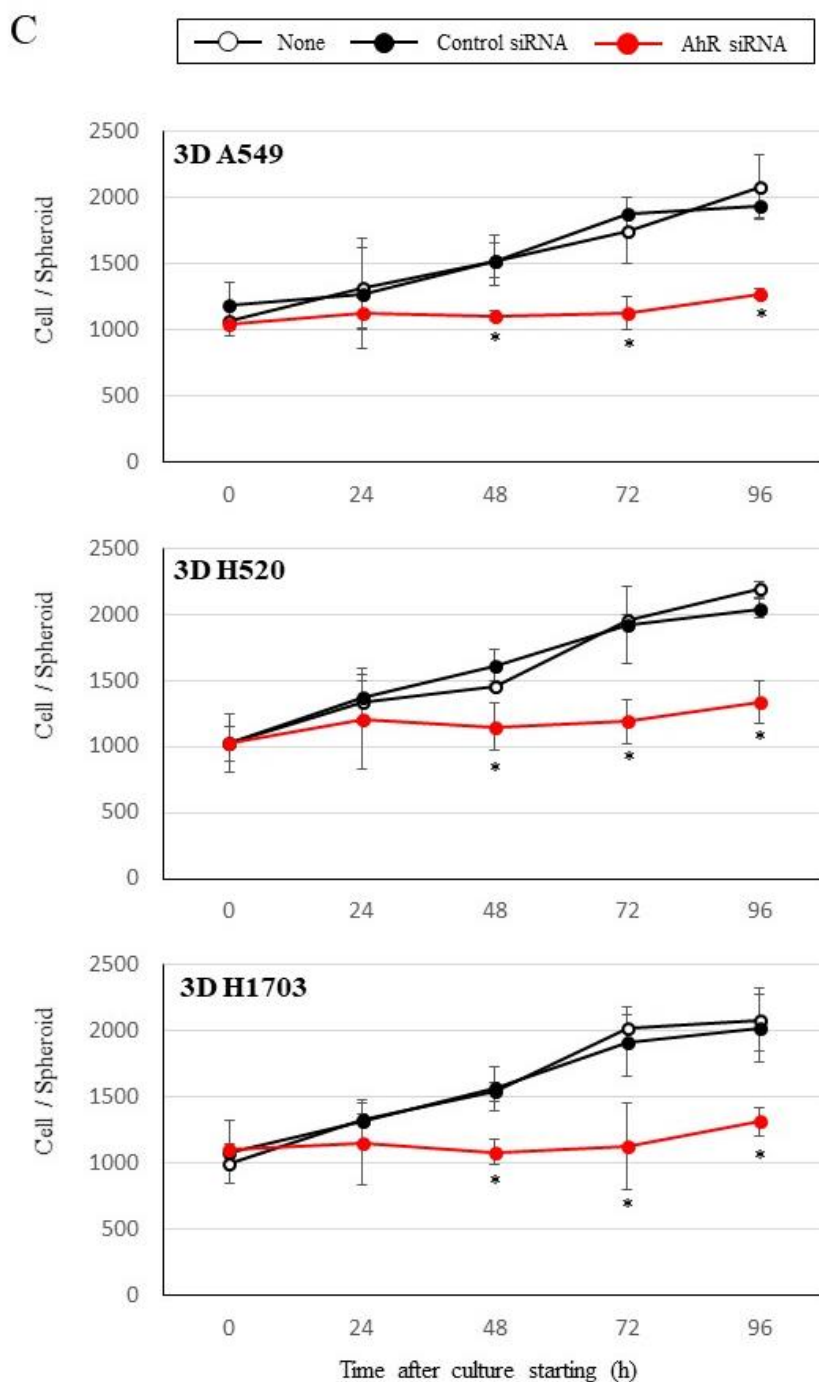


図 5. AhR ノックダウンによる細胞数変化の解析.

A: AhR ノックダウン処理による細胞数測定のスケジュール. (最終 siRNA 濃度は 2D 細胞, 3D 細胞塊共に 10 nM)  
 B: 2D 細胞における細胞数変化を細胞濃度で示した. C: 3D 細胞塊の細胞数変化を細胞数/spheroid で示した. B と C はそれぞれ 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均±標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA と *AhR* siRNA の間で統計処理を行った. \**p*<0.05

図 6

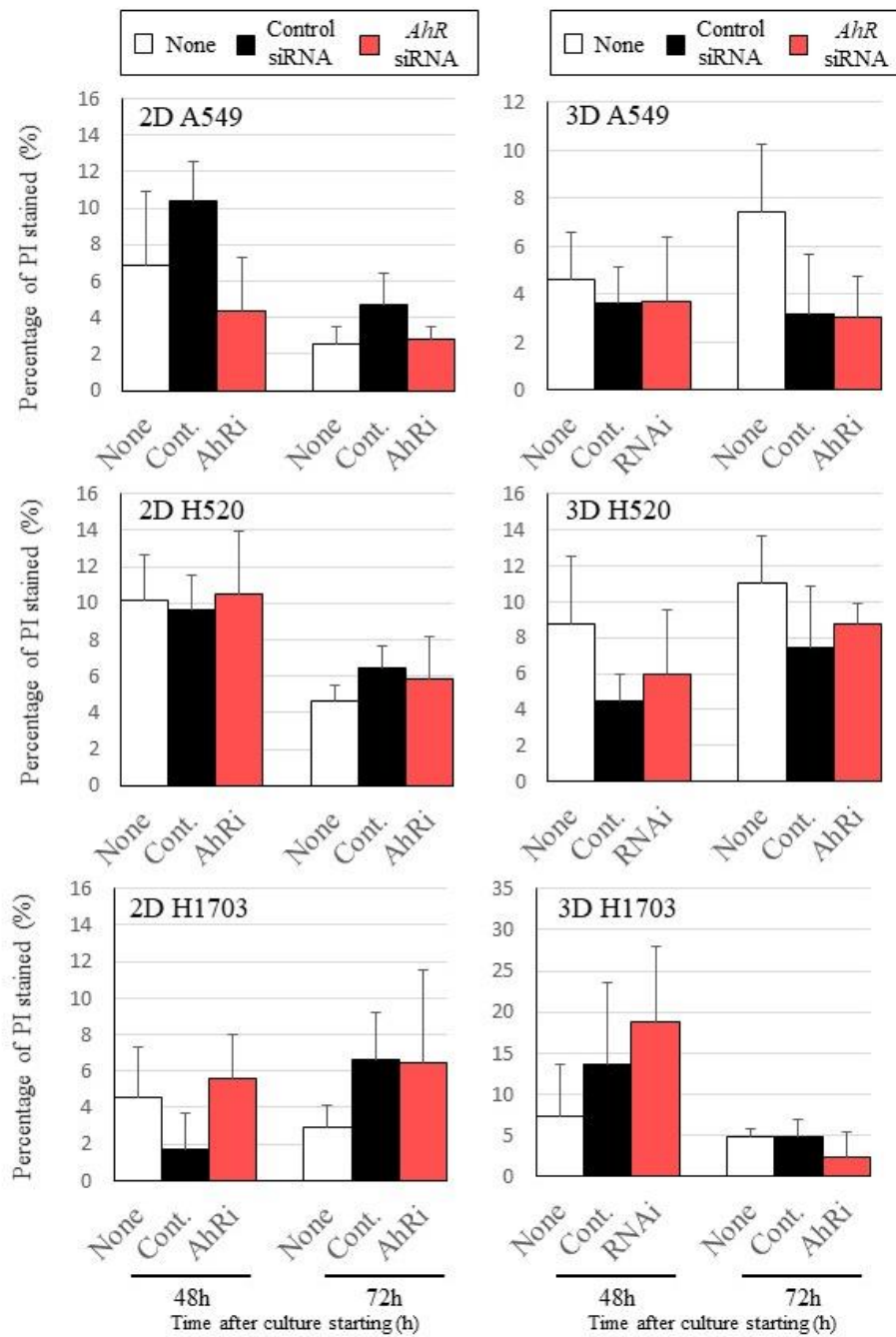


図 6. PI 染色による細胞死の判定.

*AhR* をノックダウン (最終濃度 2D 細胞, 3D 細胞塊共に 10 nM) した 2D 細胞と 3D 細胞塊において細胞死誘導が起きているかを PI 染色を用いて判定した. Y 軸は (PI 染色された細胞数 / 全細胞数) として染色された細胞の割合を示している. X 軸には細胞の処理を示した. 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均土標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA と *AhR* siRNA の間で統計処理を行った. \* $p < 0.05$

図 7A

A

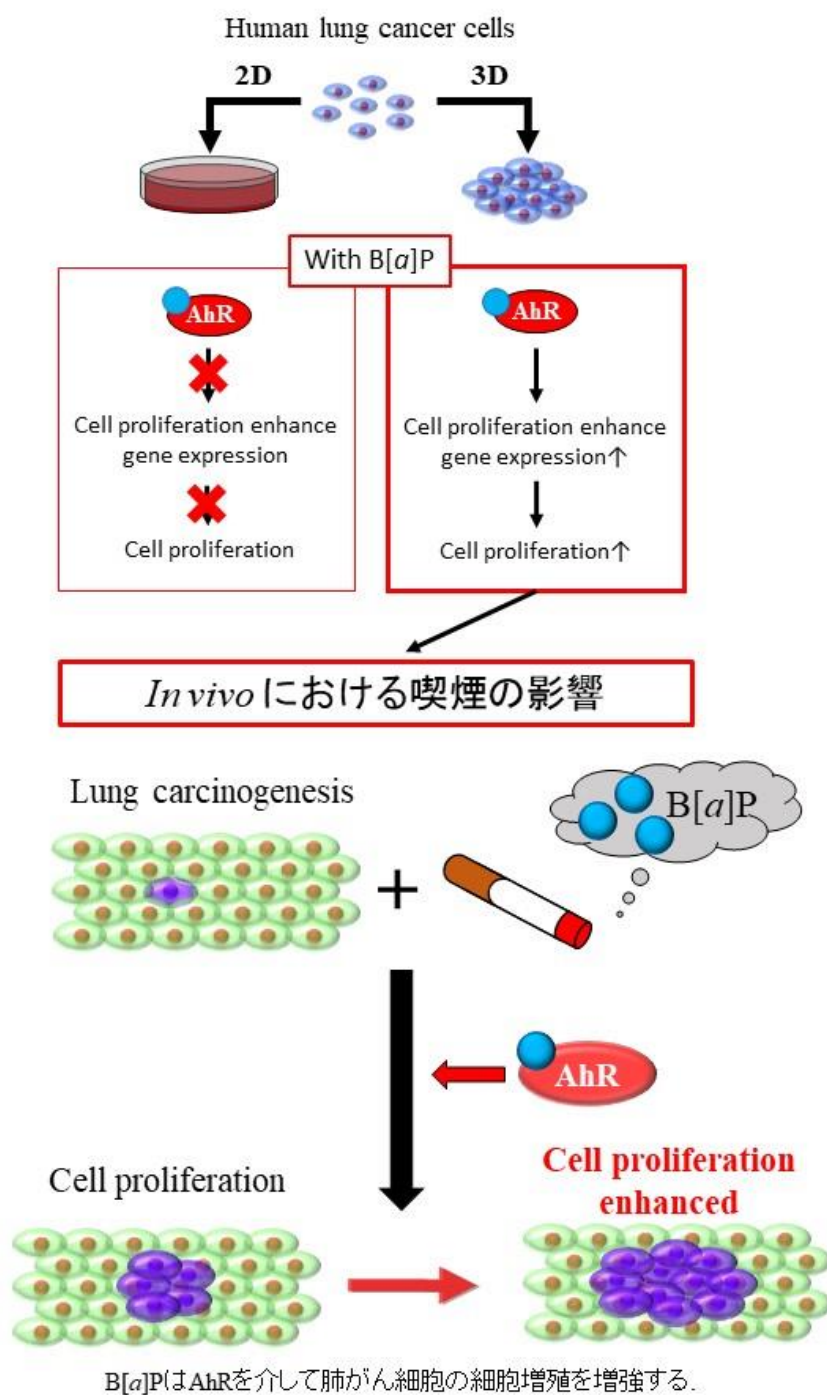
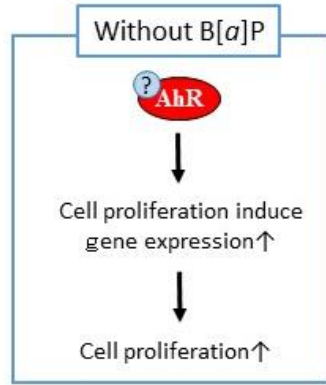


図 7B

B

Human lung cancer cells



② 内因性リガンド

図 7. 肺がん細胞における AhR を介する細胞増殖メカニズムの仮説.

A : B[a]P 添加による肺がん細胞の細胞増殖メカニズムの仮説.

B : 肺がん細胞の細胞増殖に AhR が関与するメカニズムの仮説.

図 8

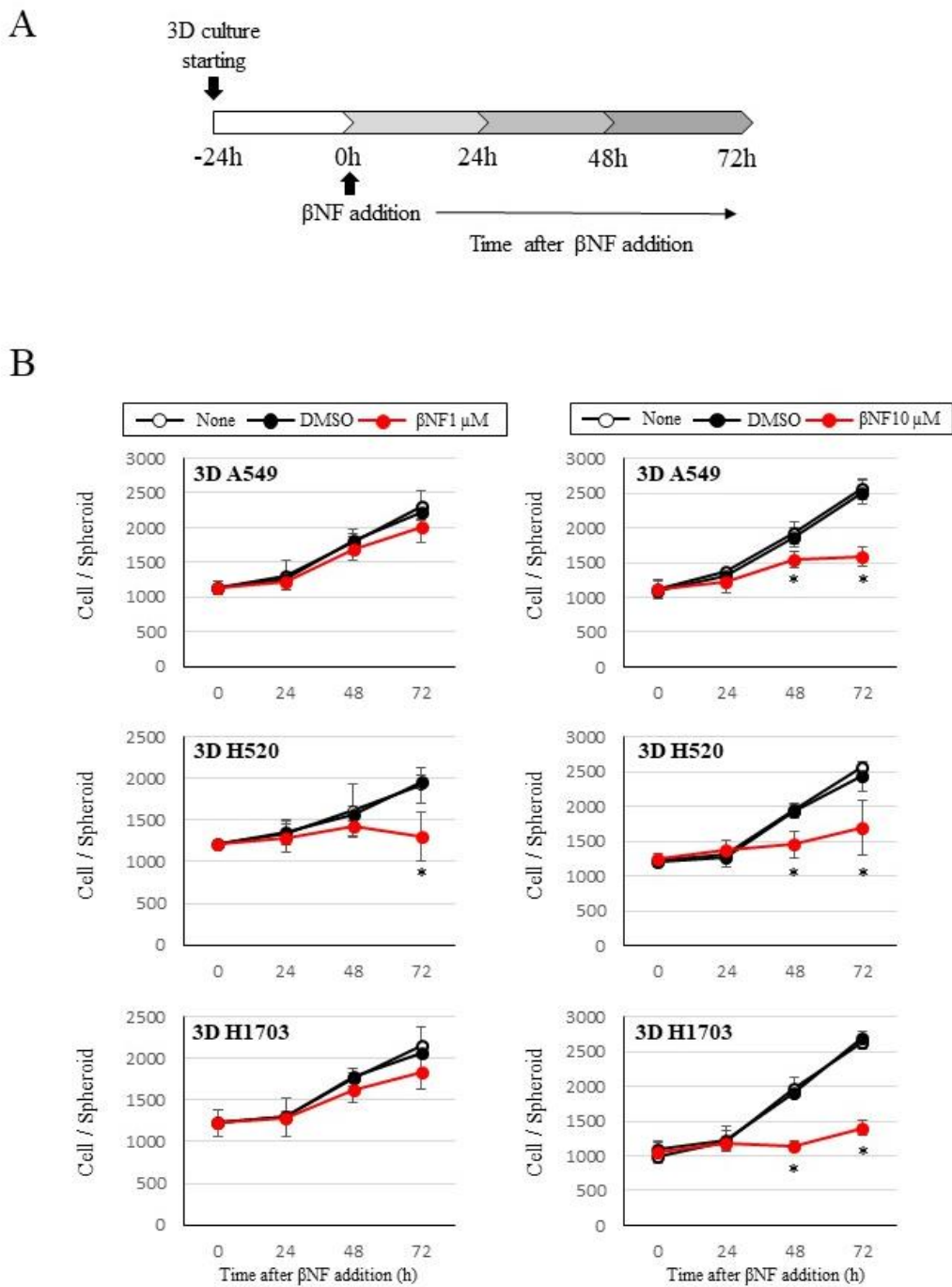


図 8. βNF 添加による 3D 細胞塊への細胞増殖に与える影響の解析.

A : βNF 添加による細胞培養スケジュール. 2D 細胞, 3D 細胞塊共に培養開始 24 時間経過後に βNF (最終濃度 1 μM および 10 μM) を添加した. B : βNF 添加による細胞数変化. 細胞数/spheroid で示し, 3 回の独立した実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均±標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて DMSO 添加サンプルと βNF 添加サンプルの間で統計処理を行った. \**p*<0.05

図 9

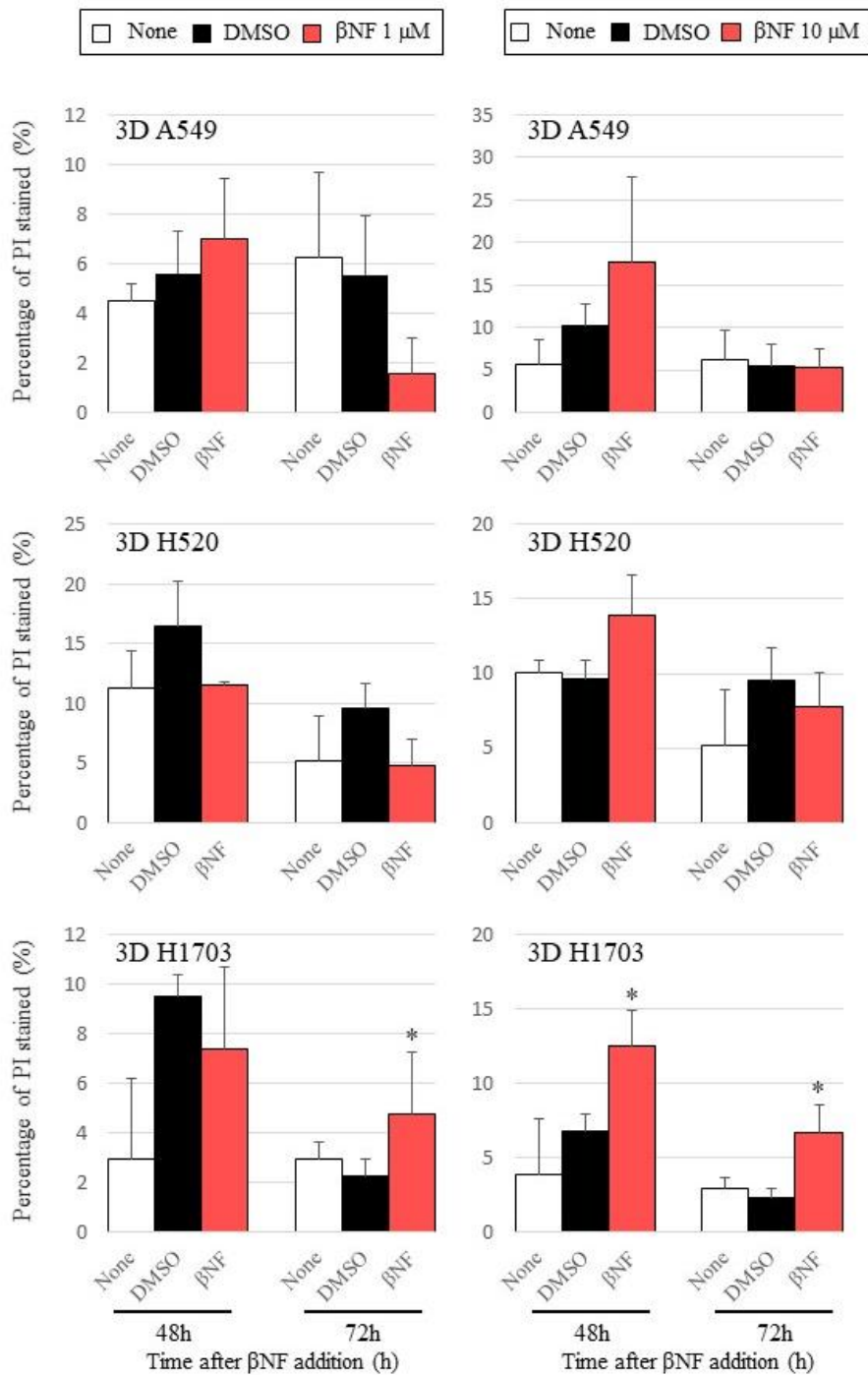


図 9. PI 染色による細胞死の判定.

3D 細胞塊の培養開始 24 時間経過後に  $\beta$ NF (最終濃度  $1 \mu\text{M}$  および  $10 \mu\text{M}$ ) を添加した. Y 軸は (PI 染色された細胞数 / 全細胞数) として PI 染色により染まった細胞の割合を示している. X 軸には細胞処理を示した. 独立した実験を 3 回繰り返し平均値を算出した. 平均  $\pm$  標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは  $t$  検定を用いて DMSO 添加サンプルと  $\beta$ NF 添加サンプルの間で統計処理を行った. \* $p < 0.05$

図 10

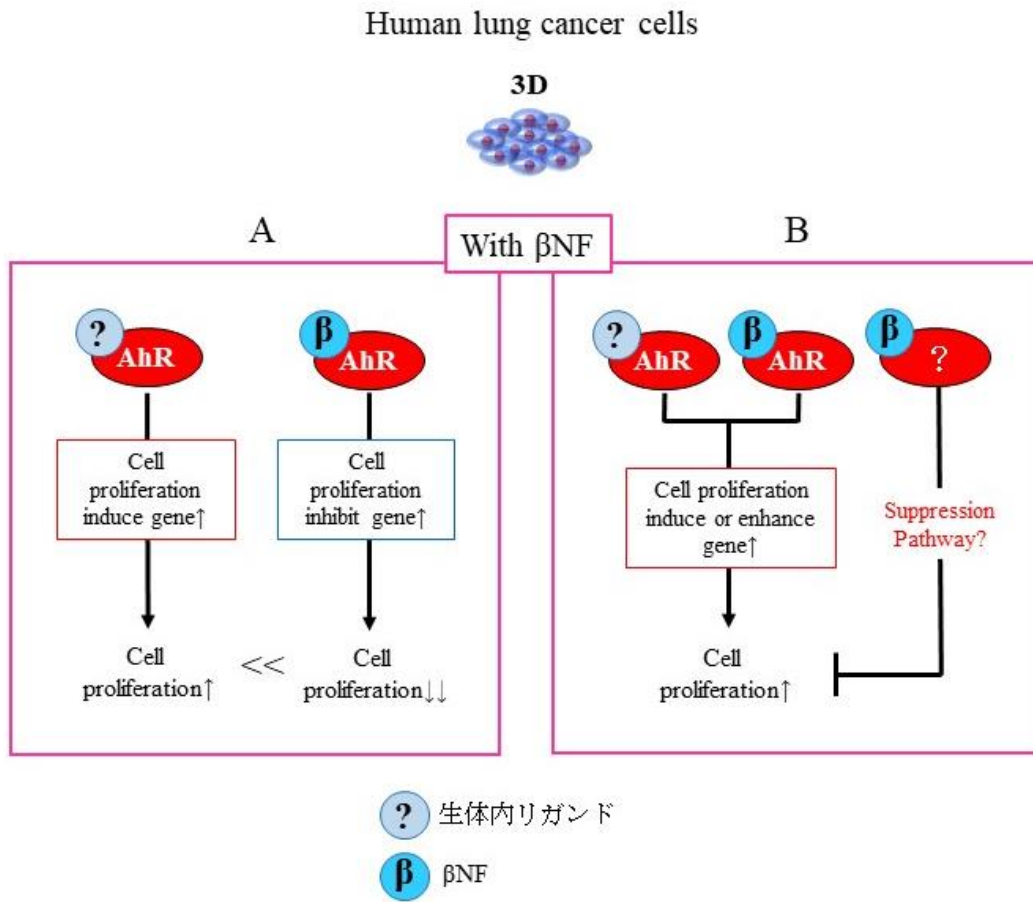


図 10.  $\beta$ NF による細胞増殖抑制メカニズムの仮説.



図 11

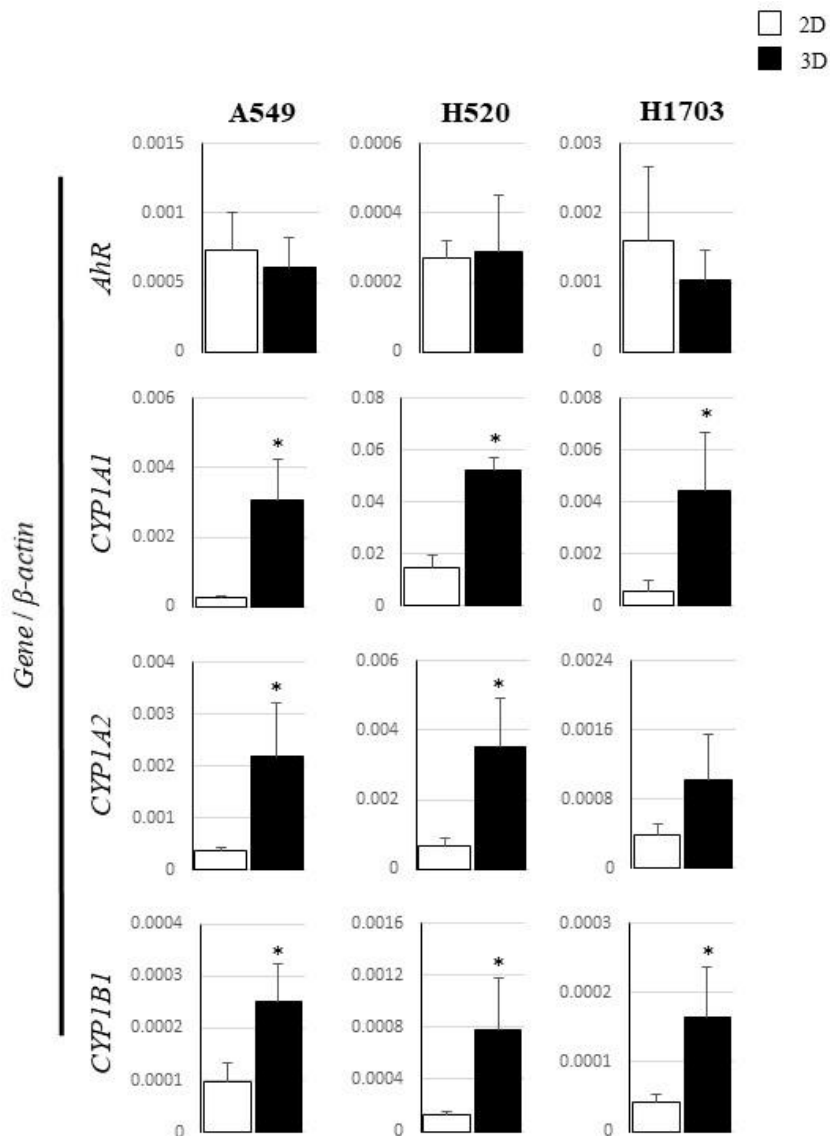
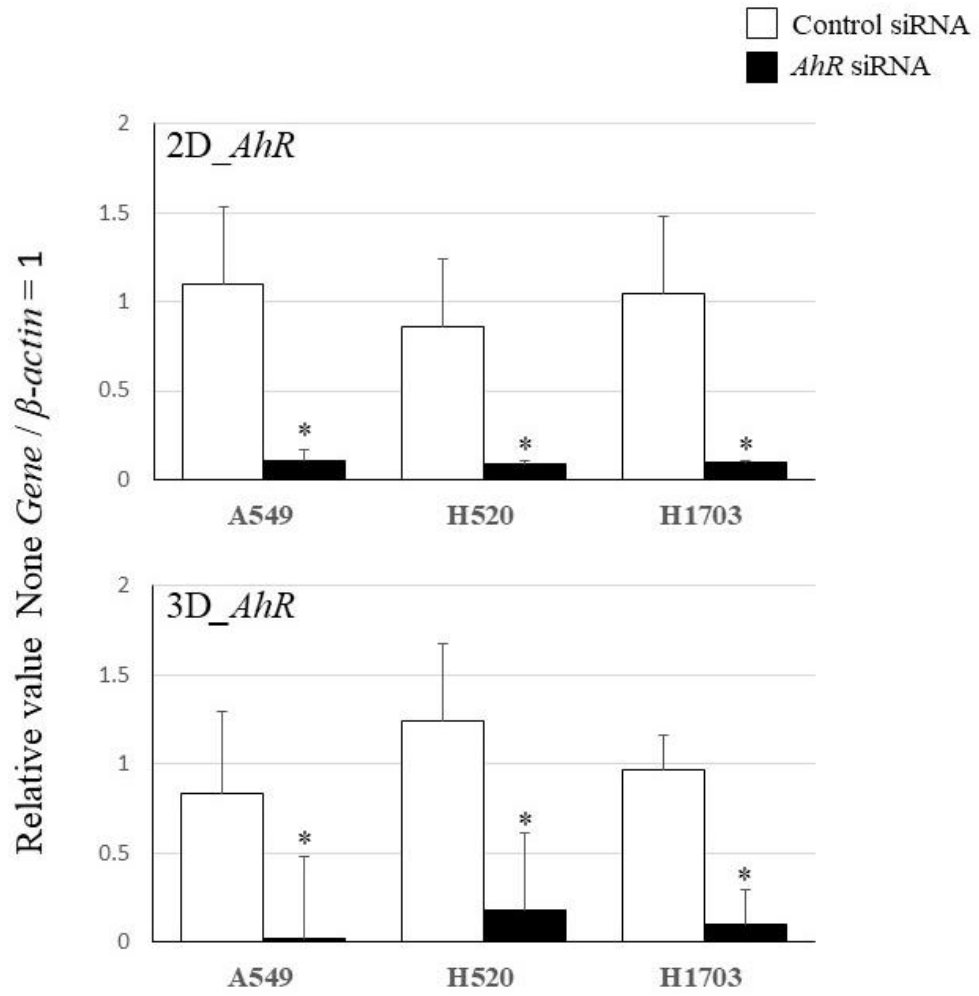


図 11. 2D 細胞と 3D 細胞塊における遺伝子発現変動の解析.

2D 細胞と 3D 細胞塊における *AhR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベルを示す. グラフは独立した 3 回の実験結果から得られたデータで, 平均値を算出し, 平均±標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて 2D 細胞の遺伝子発現レベルと 3D 細胞塊の遺伝子発現レベルの間で検定を行った. \* $p < 0.05$

A



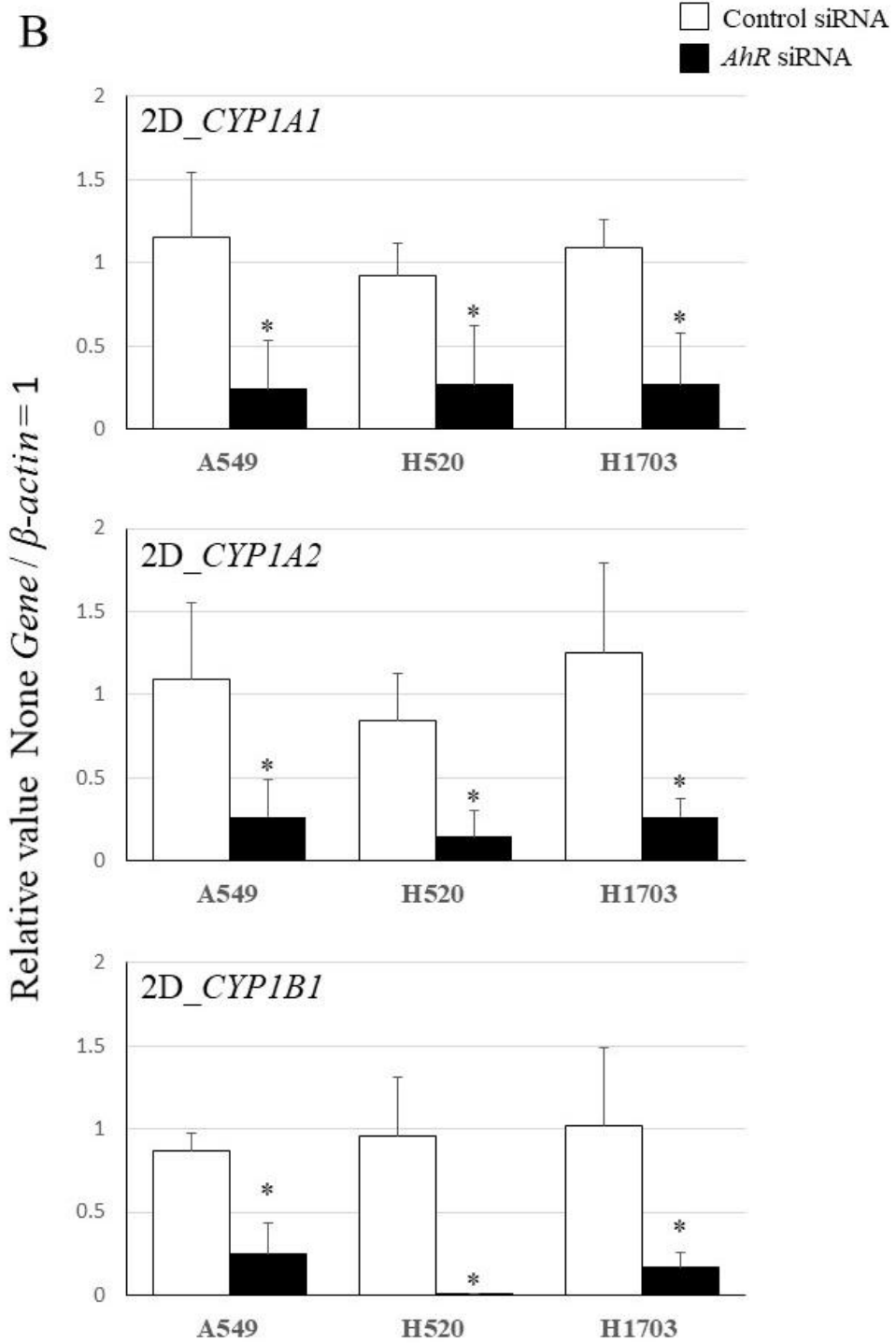


図 12C

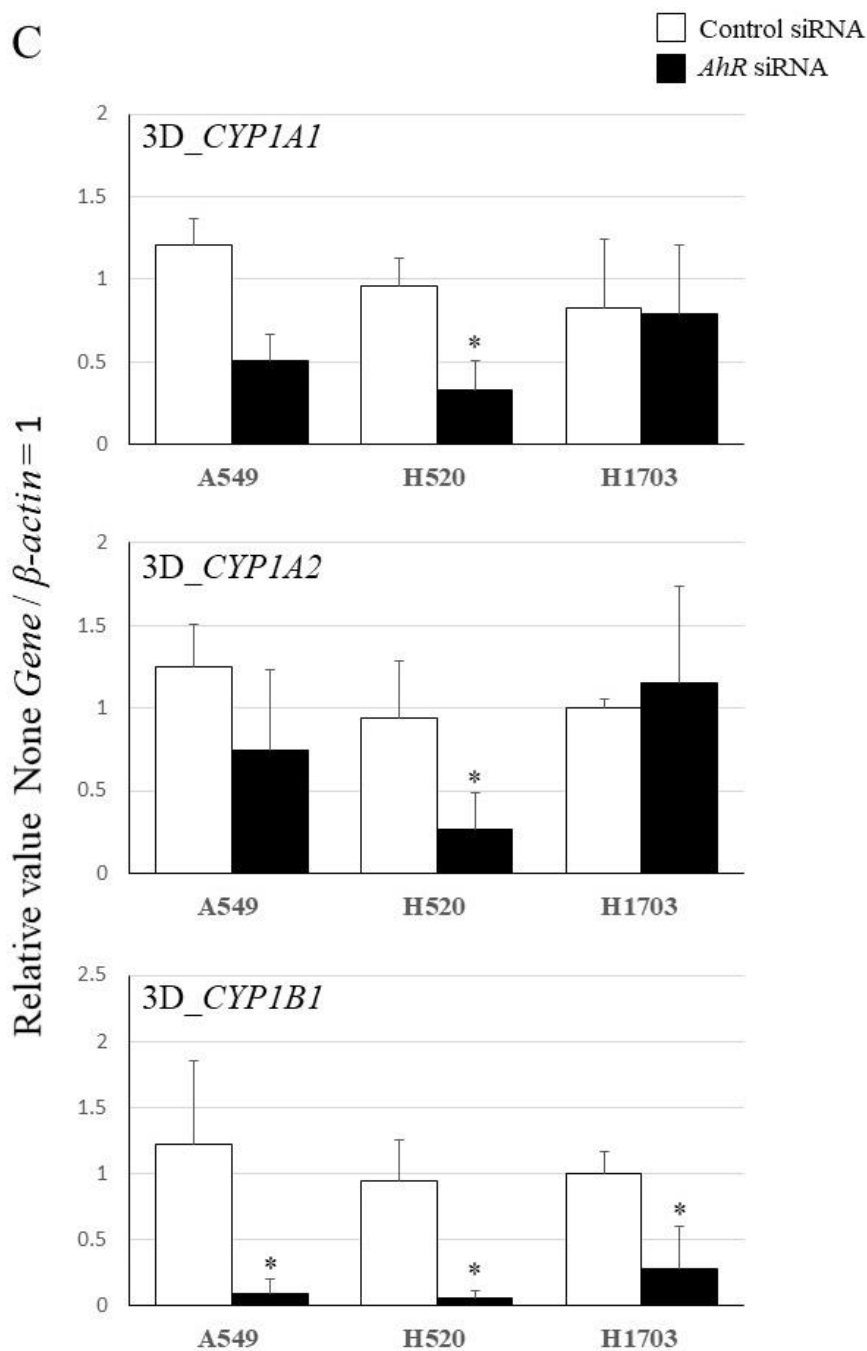
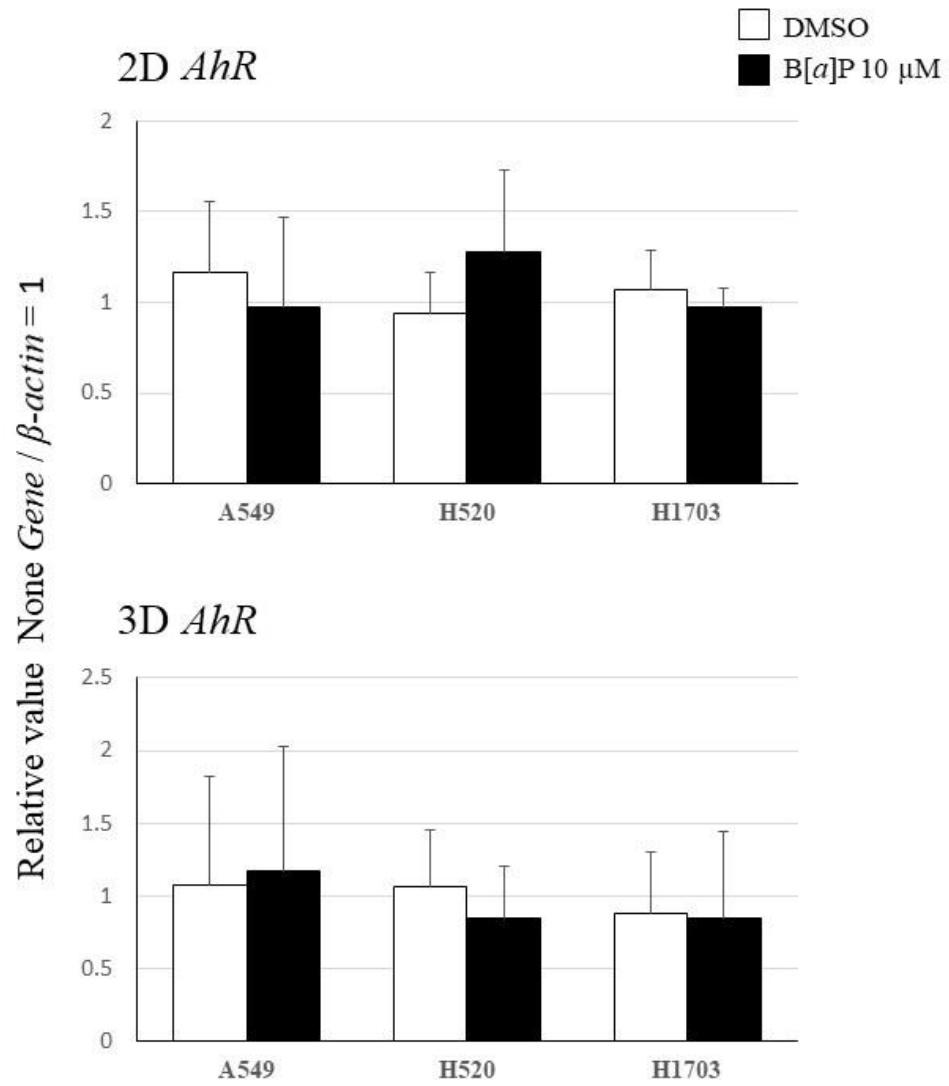


図 12. *AhR* をノックダウンした 2D 細胞と 3D 細胞塊における遺伝子変動の解析. *AhR* のノックダウンは最終 siRNA 濃度 10 nM で行った. A: 2D 細胞と 3D 細胞化における *AhR* の発現レベル B: 2D 細胞における *AhR* をノックダウンした際の目的遺伝子の発現レベル C: 3D 細胞塊における *AhR* をノックダウンした際の目的遺伝子の発現レベル  
いずれも, X 軸は細胞種を示し, Y 軸は None の遺伝子発現量 ( $\beta$ -actin で標準化) を 1 として各サンプルの遺伝子発現量を算出した. 独立した 3 回の実験より平均値を算出し, 平均土標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA 処理サンプルと *AhR* siRNA 処理サンプルの間で検定処理を行った. \* $p < 0.05$

A



**B**

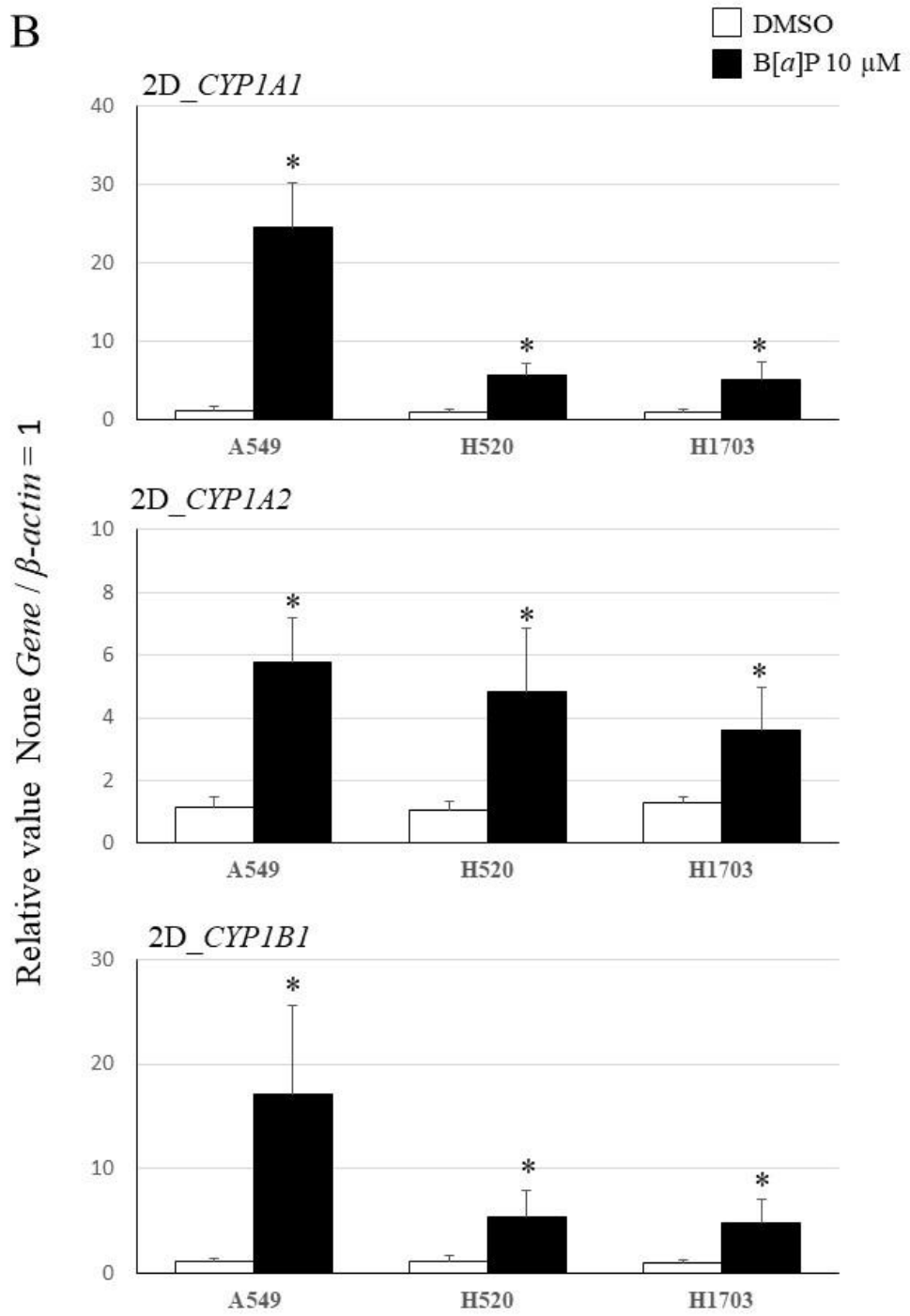


図 13C

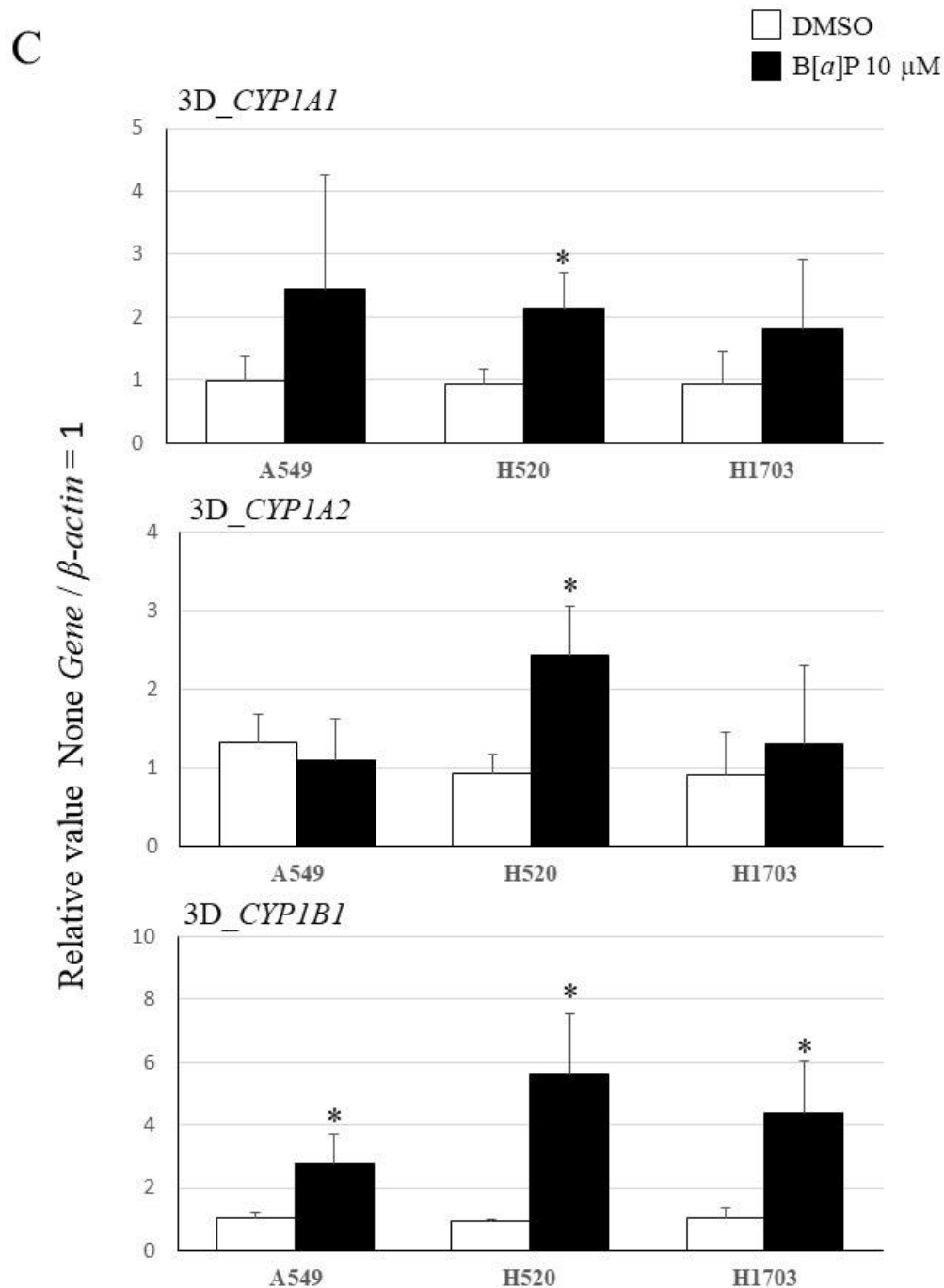
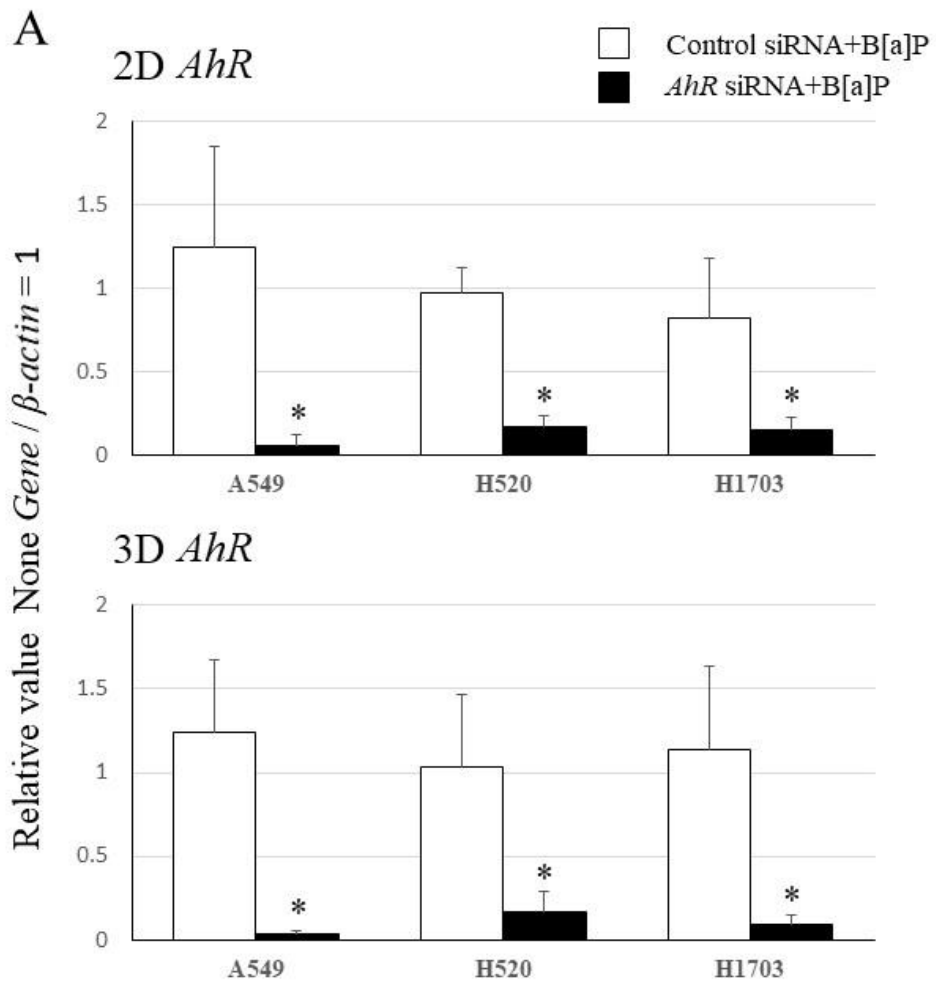


図 13. 2D 細胞と 3D 細胞塊に B[a]P (最終濃度 10 μM) を添加した際の遺伝子発現レベルの解析.

A : 2D 細胞, 3D 細胞塊それぞれの *AhR* の発現レベル. B : 2D 細胞における *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベル. C : 3D 細胞塊における *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベル. いずれも X 軸は細胞種を示し, Y 軸は得られた None の遺伝子発現量 ( $\beta$ -actin で標準化) を 1 として各サンプルの遺伝子発現量を算出した. いずれも独立した 3 回の実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均土標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて DMSO 添加サンプルと B[a]P 添加サンプルの間で統計処理を行った. \* $p < 0.05$





B

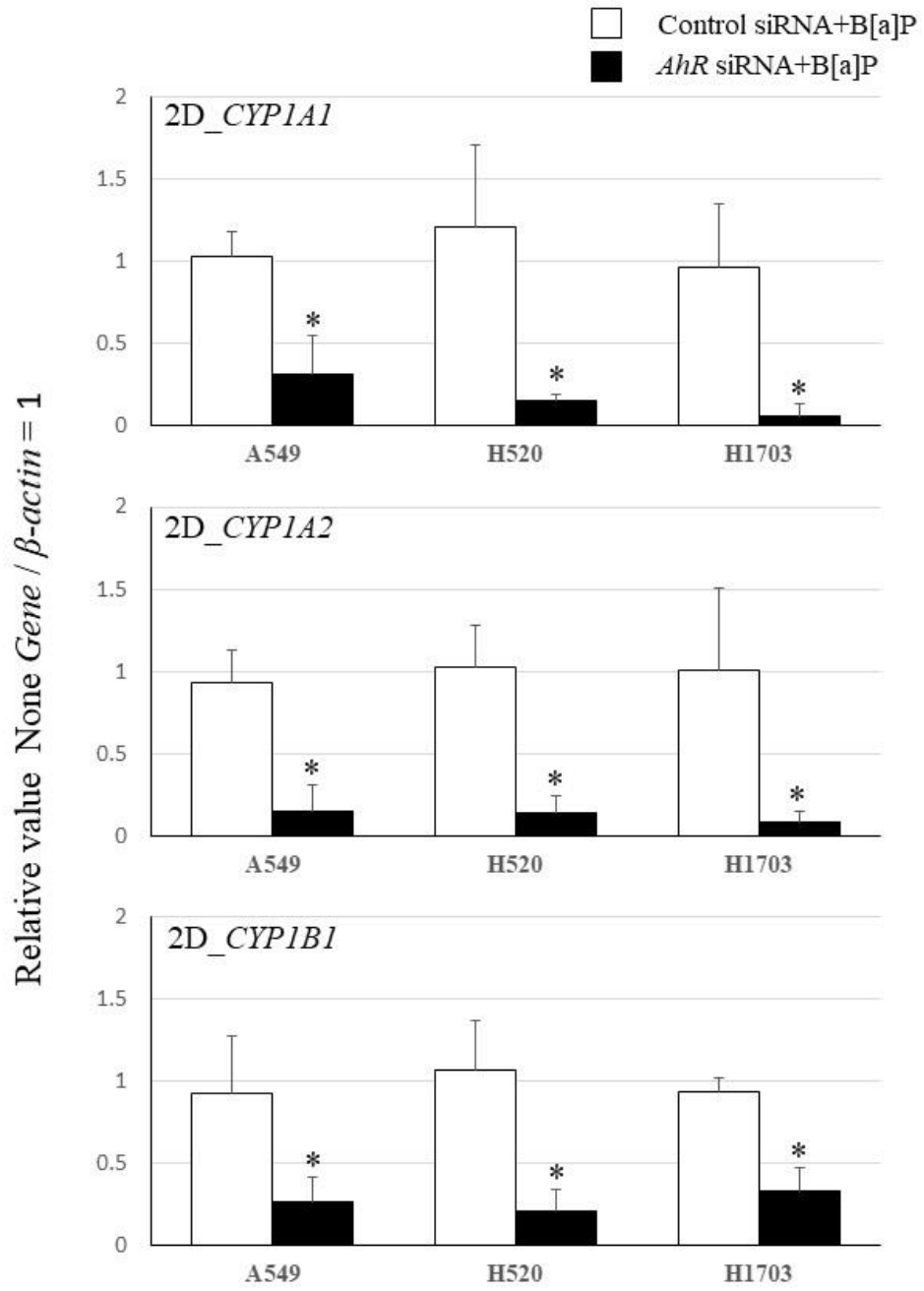


図 14C

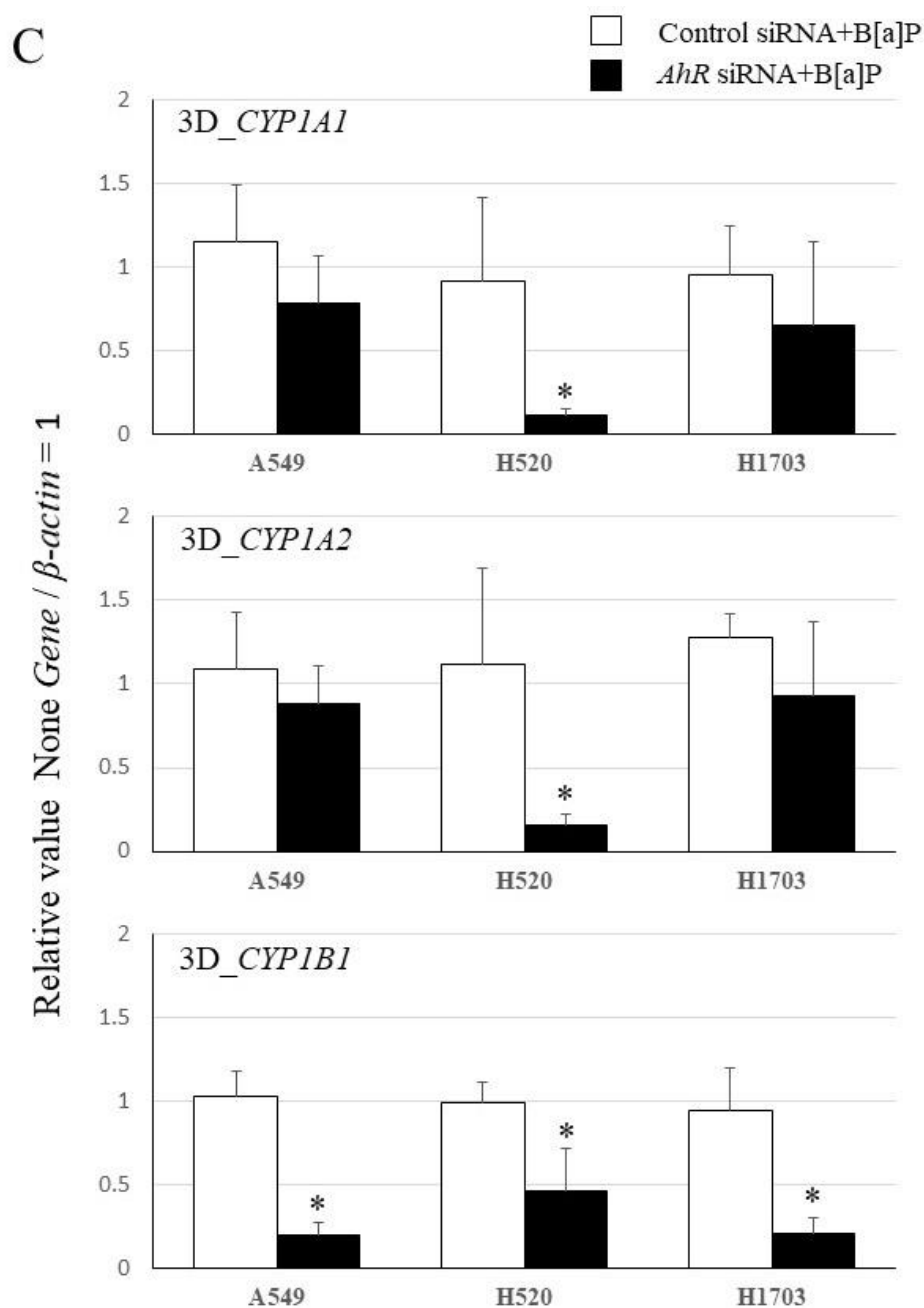


図 14. AhR ノックダウン処理をした 2D 細胞と 3D 細胞塊へ B[a]P (最終濃度 10  $\mu$ M) を添加した際の遺伝子発現レベルの解析. A: 2D 細胞, 3D 細胞塊それぞれの *AhR* の発現レベル. B: 2D 細胞における *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベル. C: 3D 細胞塊における *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* の発現レベル. いずれも X 軸は細胞種を示し, Y 軸は得られた None の遺伝子発現量 ( $\beta$ -actin で標準化) を 1 とし各サンプルの発現量を算出した. いずれも独立した 3 回の実験から得られたデータで平均値を算出し, 平均  $\pm$  標準偏差 (SD) として示した. 得られたデータは *t* 検定を用いて Control siRNA と *AhR* siRNA 添加サンプルの間で統計処理を行った. \* $p < 0.05$

図 15

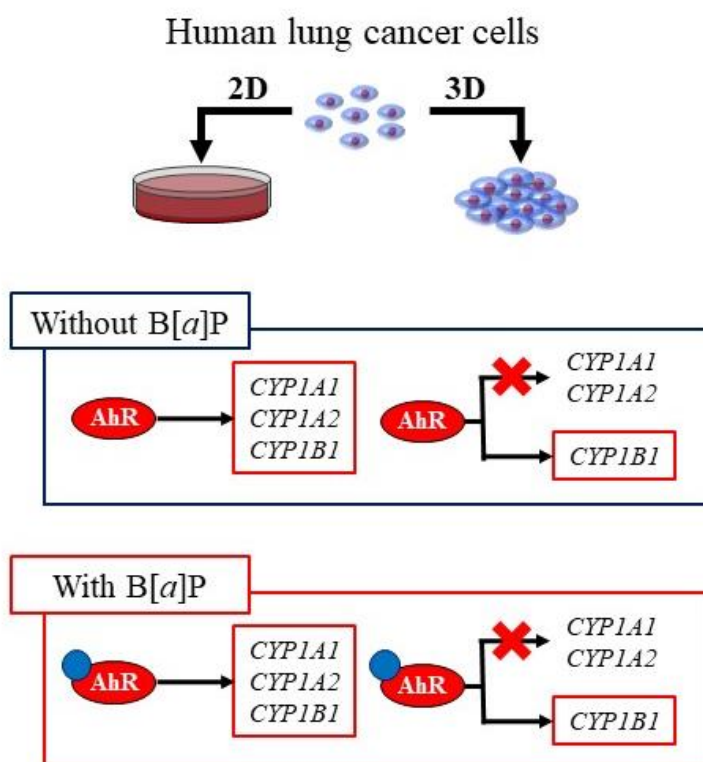


図 15. ヒト肺がん細胞の培養環境によって AhR が制御する遺伝子が異なる.

図 16

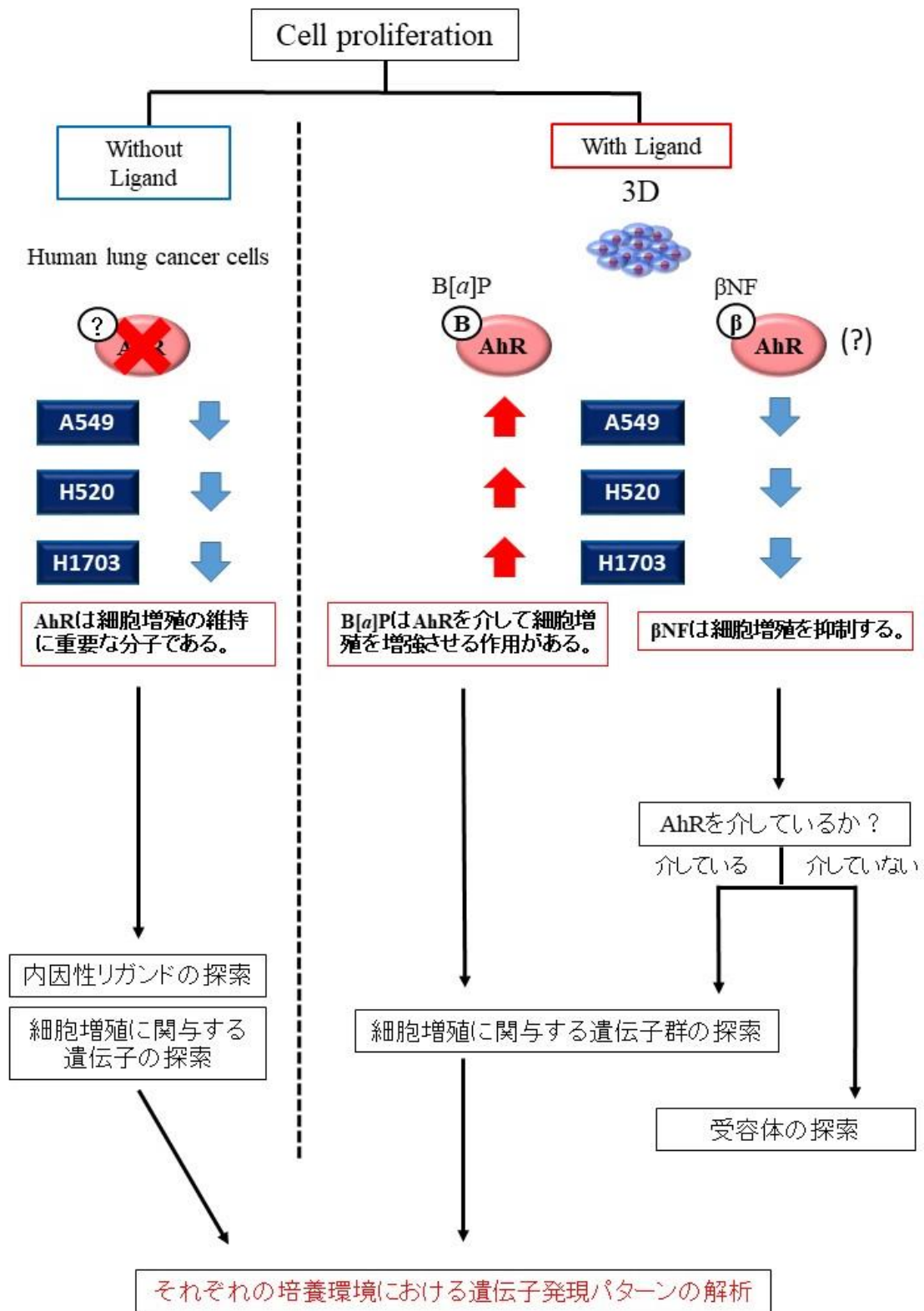


図 16. 本研究の結論と今後の課題