

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390187

研究課題名（和文）繊維・粒子状物質による呼吸器の発がん性・線維原性の包括的リスク評価システムの開発

研究課題名（英文）Risk assessment of carcinogenicity and fibrogenicity in respiratory systems induced by fibrous and particulate materials

研究代表者

平工 雄介（HIRAKU YUSUKE）

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30324510

研究成果の概要（和文）：繊維・粒子状物質は呼吸器で慢性炎症を惹起し、発がんや線維化を起こす。本課題では動物とヒトの肺組織を用いて、炎症条件下で生じる酸化・ニトロ化 DNA 損傷が石綿曝露と相関することを明らかにした。炭素系ナノ素材は肺上皮細胞に取り込まれ、ニトロ化 DNA 損傷を誘導した。これらの DNA 損傷塩基は発がんリスク評価指標として期待できる。また実験動物およびヒト血漿を用いて、線維化関連分子が炎症関連発がんに関わる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Inhalation exposure to fibrous and particulate materials induces chronic inflammation in respiratory systems, leading to carcinogenesis and fibrosis. We have demonstrated that inflammation-mediated oxidative/nitrative DNA damage is closely associated with asbestos exposure in animal and human lung tissues. Carbon nanomaterials induced nitrative DNA damage in human lung epithelial cells through cellular internalization. In addition, we demonstrated that molecules involved in tissue fibrosis participate in inflammation-related carcinogenesis using experimental animals and human plasma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：繊維・粒子状物質、石綿、リスク評価、発がん、慢性炎症、活性酸素・窒素種、DNA 損傷、8-ニトログアニン

1. 研究開始当初の背景

労働現場および一般環境中には種々の繊維・粒子状物質が存在し、ヒトの疾病の原因となりうる。とりわけ石綿(アスベスト)によ

る健康影響が現在重大な社会問題となっている。尼崎市の石綿関連工場では労働者のみならず、多くの周辺住民に悪性中皮腫の発生が認められた。近年、種々のナノ素材(人為的に生産された粒径 100 nm 以下の微粒子)が、

工業や医療などへの応用を目的として開発されている。カーボンブラック(CB)はタイヤなどのゴム製品、インク、塗料などの用途に使用されている。CBはラットへの吸入曝露で肺がんを起し、国際がん研究機関(IARC)はヒトに発がん性を有する可能性がある(group 2B)と評価している。カーボンナノチューブ(CNT)は機械的強度が高く、耐熱性、熱伝導性、電気伝導性に優れるなどの理由から、種々の産業への応用が期待されている。動物実験では、CNTの腹腔内投与による中皮腫が報告されており、ヒトへの健康影響が懸念されている。

繊維・粒子状物質は吸入すると肺に蓄積し、曝露源から離れても炎症が持続して発がんや線維化などの健康障害をもたらす。しかしヒトへの健康障害の分子機構は不明な点が多く、曝露指標やリスク評価指標は確立されていない。したがって、このような物質のリスクを早期に評価し、疾病予防に寄与するシステムの確立が急務である。

慢性炎症条件下では、炎症細胞や上皮細胞から産生される活性酸素・窒素種による酸化・ニトロ化 DNA 損傷が発がん重要な役割を果たすと考えられる。我々は、種々の臨床検体や動物モデルで変異誘発性 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンが炎症関連がんの発生・進展の過程で生成され、患者の予後に関連することを世界に先駆けて明らかにした(*Environ. Health Prev. Med.* 2010)。したがって、8-ニトログアニンは繊維・粒子状物質による発がんリスク評価に資するバイオマーカーとなりうる可能性が考えられる。

慢性炎症に伴う組織の線維化は、炎症細胞などから産生される活性酸素・窒素種、サイトカイン、プロテアーゼなどを介した線維芽細胞の増生とコラーゲンの産生により起こると考えられているが、詳細な分子機構は不明である。近年、細胞外マトリクスなどを基質とするマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)が線維化、がんなどの様々な疾病に関与する可能性が注目されている。これらの分子の発現を解析することで、疾病のリスクや進行度を評価する指標を見いだせる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

本課題では繊維・粒子状物質として、特に石綿および炭素系ナノ素材(CNT および CB)に注目して研究を行った。石綿に関しては、マウスに石綿を気管内投与した動物モデルを作製し、肺組織における DNA 損傷性を石綿繊維の種類により比較検討する。さらに、ヒトの肺組織を用いて、石綿曝露と DNA 損傷性との関連を解析し、曝露指標およびリス

ク評価指標としての応用可能性を検討する。ヒトレベルでの健康障害性が不明なナノ素材については、培養細胞を用いた実験系を構築し、DNA 損傷性を検討してその分子機構を解明する。

また、炎症関連発がんおよび線維化病変のモデルとしてタイ肝吸虫感染動物を作製し、DNA 損傷塩基の生成および MMP などの線維化関連分子の発現を解析して、組織の線維化と発がんに至る分子機構について検討する。さらに、タイ肝吸虫感染者の血漿における線維化関連分子の解析を行い、病態の進展と疾病のリスクを評価するマーカーを探索する。以上の研究を総合し、発がん性と線維原性に着目した健康障害リスク評価システムの確立を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)石綿曝露動物の肺組織における DNA 損傷の解析: ICR 雄性マウス(6 週齢)に石綿[クリソタイル(白石綿)あるいはクロソドライト(青石綿)、0.05 および 0.2 mg/回]を 1 週間ごとに 4 回気管内投与し、翌日肺組織を摘出した。肺組織のパラフィン切片を作成し、我々が独自に作製したウサギポリクローナル抗体(*Methods Mol. Biol.* 2009)を用いて免疫組織染色を行い、8-ニトログアニン(図)の生成を解析した。酸化 DNA 損傷塩基 8-オキシデオキシングアノシン(8-oxodG)の生成、誘導性 NO 合成酵素(iNOS)およびその転写因子 NF- κ B の発現についても市販の抗体で同様に解析した。気管支上皮における染色性の強さは、画像解析ソフト ImageJ を用いて定量的に評価した。

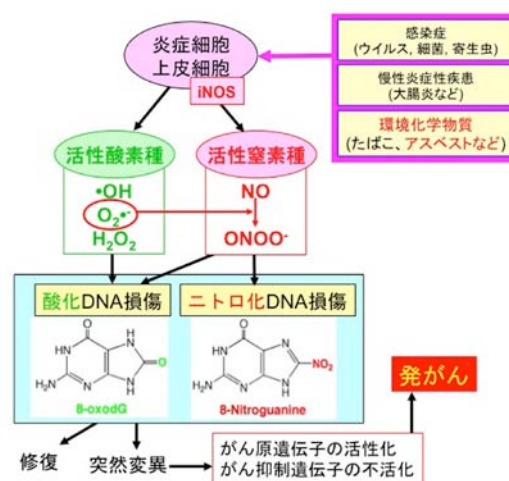


図 慢性炎症条件下における酸化・ニトロ化 DNA 損傷

(2)ヒト肺組織における石綿繊維量と DNA 損傷との関連の解析：石綿曝露と肺組織における DNA 損傷との関連を明らかにするため、以下の実験を行った。悪性中皮腫患者(n=15)および非石綿関連疾患患者(石綿肺、肺癌、悪性中皮腫を有しない)の肺組織(n=21)の剖検あるいは手術標本を得て、ホルマリン固定した。無機繊維の解析については、組織を低温灰化し、透過型分析電子顕微鏡により乾燥組織重量あたりの繊維[クリソタイル、角閃石系石綿(クロシドライト、アモサイトなど)、非石綿繊維]を計数した。またパラフィン包埋切片を作成し、組織中の DNA 損傷塩基(8-ニトログアニンおよび 8-oxodG)、iNOS、8-oxodG の修復酵素 OGG1 の発現について、免疫組織染色法で解析した。標本を光学顕微鏡で観察し、これらの分子の染色強度を各視野ごとにスコア化して全視野の平均値を計算し、各標本の染色強度とした。その値と無機繊維量との相関を統計学的に解析した。

(3)炭素系ナノ素材による細胞内 DNA 損傷の解析：炭素系ナノ素材については、多層 CNT(MWCNT)および CB を用いた。MWCNT については、直径の異なる 2 種類の材料[直径 20-30 nm (CNT20)あるいは 40-70 nm (CNT40)、長さ 0.5-2 μm 、和光純薬工業(株)製]を用いた。CB については、一次粒径の異なる 2 種類の材料[粒径 56 nm (CB56)あるいは 95nm (CB95)、Degussa 製]を用いた。

MWCNT および CB を細胞培地(5%胎児ウシ血清含有 DMEM)に懸濁し、超音波処理による凝集体の分散および遠心沈降による粗大粒子の除去を行った。遠心後の上清をヒト肺胞上皮由来の A549 細胞あるいはマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞に添加し、一定時間培養した。8-ニトログアニンの生成および iNOS の発現は、蛍光免疫細胞染色法により解析した。細胞あたりの染色性の強度は、画像解析ソフトにより定量的に評価した。細胞内への粒子の取り込みについては、透過型電子顕微鏡により観察した。

(4)炎症関連疾患における線維化関連分子の役割の解明：タイ・コンケン大学との国際共同研究を行い、炎症関連発がんおよび線維化病変の動物モデルとして、肝内胆管癌を起こすタイ肝吸虫に感染させたハムスターを作製した。肝組織における線維化関連分子の発現と DNA 損傷塩基の生成は免疫組織染色法で解析した。さらに、タイ肝吸虫感染者を対象として、血漿中のコラーゲンや MMP などの線維化関連分子を ELISA 法で定量し、組織の線維化および発がんとの関連を解析する分子疫学研究を行った。

4. 研究成果

(1)石綿曝露マウスの肺組織における DNA 損傷：石綿(クリソタイルあるいはクロシドライト)を気管内投与したマウスの肺組織では、8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の生成が特に気道上皮細胞での核で認められた。iNOS および NF- κ B の発現も気管支上皮細胞で認められた。画像ソフトによる解析の結果、8-ニトログアニンの染色性は、クロシドライトを投与した方がクリソタイルの場合に比べて、特に低用量(0.05 mg/回)で有意に強いという注目すべき知見を得た($p < 0.01$ by ANOVA)。また 8-oxodG、iNOS、NF- κ B についても同様の結果を得た。以上の結果から、石綿曝露により肺組織で慢性炎症が起これ、NF- κ B 依存性の iNOS 発現を介して炎症細胞や上皮細胞から活性種が産生され、DNA 損傷を起こして発がんに関与すると考えられる。クロシドライトはクリソタイルより発がん性が強く、肺組織における DNA 損傷の強さと合致するという結果は大変興味深い。8-ニトログアニンおよびその生成過程に関わる分子は、石綿による発がんリスク評価に資するバイオマーカーとして応用できることが期待される(*Ann. NY Acad. Sci.* 2010)。

(2)ヒト肺における石綿繊維量と DNA 損傷の関連：ヒト肺組織中の無機繊維量を解析した結果、クリソタイルおよび角閃石系石綿の量は、悪性中皮腫群で非石綿関連疾患群に比して有意に多かった($p < 0.01$, Mann-Whitney *U* test)。DNA 損傷塩基(8-ニトログアニンおよび 8-oxodG)の生成と iNOS および OGG1 の発現は、肺胞上皮細胞、気道上皮細胞、炎症細胞で認められた。

特に興味深い知見として、非石綿関連疾患群では、肺組織における 8-ニトログアニン、8-oxodG、OGG1 の染色強度が角閃石系石綿量と有意に相関した($p < 0.05$, Spearman's rank correlation)。しかし、クリソタイル量との相関は認めなかった。8-oxodG と OGG1 の染色強度は対象者の年齢とも有意に相関し、加齢の影響を受ける可能性が示唆された。悪性中皮腫群では上記分子の染色強度と石綿繊維量との相関を認めなかった。

以上の結果から、ヒトでも石綿曝露による炎症反応を介して酸化・ニトロ化 DNA 損傷を起こし、発がんに関与する可能性が考えられる。特に石綿関連疾患を発症する前の段階で、発がん性が強い角閃石系石綿の量と DNA 損傷性が有意に相関する結果は大変興味深い。上記の結果から、これらの DNA 損傷塩基、特に 8-ニトログアニンは、石綿の曝露評価および発がんリスク評価の指標になりうると考えられる。本研究の成果は、2011 年に

日本産業衛生学会優秀演題に選出された。

(3)MWCNT による細胞内 DNA 損傷：
MWCNT で処理した A549 細胞では、CNT20 および CNT40 のいずれも 4 時間で濃度依存的に 8-ニトログアニン生成を誘導した。細胞あたりの染色強度を画像解析ソフトで解析した結果、両者は 4-24 時間で有意に 8-ニトログアニン生成および iNOS 発現を増加させた。両者の 8-ニトログアニン生成能の間には有意差を認めなかった。培養上清中の NO の産物である NO₂ の濃度をグリース法で定量した結果、MWCNT 処理により 4-8 時間で有意に増加した。フローサイトメトリーの結果、活性酸素の生成は 24 時間でのみ認められた。8-ニトログアニン生成は、iNOS 阻害剤、NF-κB 阻害剤、カベオラおよびクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤の添加により著明に抑制された。透過型電子顕微鏡による観察では、大部分の MWCNT は細胞質内のリソソーム様小胞内に存在したが、一部は核内に認められた。MWCNT の細胞内への取り込みは、エンドサイトーシス阻害剤により抑制された。以上の結果から、MWCNT は食食能を有しない肺胞上皮細胞でエンドサイトーシスにより取り込まれ、iNOS 発現などの炎症性反応およびニトロ化 DNA 損傷を惹起し、発がんに寄与する可能性が考えられた (*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012)。

(4)CB による細胞内 DNA 損傷の解析：CB は A549 細胞および RAW264.7 細胞の両者で 8-ニトログアニンを生成した。興味深いことに、粒径の大きい CB95 は、両者の細胞で CB56 より短時間で DNA 損傷を起こした。フローサイトメトリーおよびグリース法では、CB95 の方が、RAW 細胞において CB56 より有意に多く活性酸素および NO を生成した。フローサイトメトリーで側方散乱光を測定した結果、CB95 の方がより細胞内に取り込まれやすいことが判明した。8-ニトログアニンの生成と iNOS の発現は、エンドサイトーシス阻害剤および NF-κB 阻害剤により抑制された。透過型電子顕微鏡による観察では、A549 細胞のリソソーム様小胞に CB の存在を認めた。

以上の結果から、CB はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、DNA 損傷を起こすが、CB95 の方がより取り込まれやすく、より強い活性種の生成能および DNA 損傷能を有すると考えられた。ナノ素材の DNA 損傷性は、必ずしも粒径が小さいほど強いとは限らず、遺伝毒性を発揮する適当な粒子サイズや形状が存在すると考えられた。

(5)炎症関連疾患における線維化関連分子

の役割：炎症に起因する組織の線維化および発がんのモデル動物として、タイ肝吸虫感染ハムスターを作成し、肝組織における線維化に関わる MMP-9 の発現を介して活性窒素種を生成し DNA 損傷をもたらす新しい分子機構を発見した (*Int. J. Cancer* 2010)。また、この動物モデルを用いて、抗酸化剤クルクミンが DNA 損傷および MMP-9 発現を抑制し、炎症関連発がんの予防に有効であることを明らかにした (*Int. J. Cancer* 2011)。また、クルクミンは実験動物および培養細胞を用いた実験から、抗酸化作用に加え、細胞死の促進、細胞増殖の抑制、がんの浸潤および血管新生の抑制など、多様な分子機構に作用してがん予防効果をもたらすことを明らかにした (*Int. J. Cancer* 2011)。さらに、タイ肝吸虫感染者を対象とした分子疫学研究において、血漿中の線維化関連分子のうち、ヒドロキシプロリン、コラーゲン I、MMP-7、MMP-9、TIMP-2 が組織の線維化病変あるいは発がんのリスク評価指標になりうることを明らかにした (*Int. J. Cancer* 印刷中)。

本課題において、ヒト生体試料を使用する研究については、三重大学医学部倫理審査委員会および共同研究者の施設の倫理委員会の承認のもとで行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者、連携研究者及び研究協力者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

1. Prakobwong S, Charoensuk L, Hiraku Y, Pinlaor P, Pairojkul C, Mairiang E, Sithithaworn P, Yongvanit P, Khuntikeo N, Pinlaor S. Plasma hydroxyproline, MMP-7 and collagen I as novel predictive risk markers of hepatobiliary disease-associated cholangiocarcinoma. *Int. J. Cancer* 査読有(掲載決定).
2. Guo F, Ma N, Horibe Y, Kawanishi S, Murata M, Hiraku Y. Nitrate DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 査読有, **260**: 183-192 (2012)
3. Prakobwong S, Khoontawad J, Yongvanit P, Pairojkul C, Hiraku Y, Sithithaworn P, Pinlaor P, Aggarwal BB, Pinlaor S. Curcumin decreases cholangiocarcinogenesis in hamsters by suppressing inflammation-mediated molecular events related to multistep carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 査読有, **129**: 88-100 (2011)
4. Prakobwong S, Yongvanit P, Hiraku Y, Pairojkul C, Sithithaworn P, Pinlaor P, Pinlaor S. Involvement of MMP-9 in peribiliary fibrosis

and cholangiocarcinogenesis via Rac1-dependent DNA damage in a hamster model, *Int. J. Cancer* 査読有, **127**: 2576-2587 (2010)

5. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.* 査読有, **1203**: 15-22 (2010)
6. Hiraku Y. Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance. *Environ. Health Prev. Med.* 査読有, **15**: 63-72 (2010)
7. Hiraku Y, Kawanishi S. Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis. *Methods Mol. Biol.* 査読有, **512**: 3-13 (2009)

[学会発表] (計 27 件)

1. 平工雄介, 酒井潔, 柴田英治, 上島通浩, 久永直見, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, ヒト肺組織における石綿繊維量と DNA 損傷との関連、第 82 回日本衛生学会総会、京都市、2012 年 3 月 24~26 日
2. Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 平工雄介, 多層カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷: 繊維長との関連、第 82 回日本衛生学会総会、京都市、2012 年 3 月 24~26 日
3. 平工雄介, 感染・炎症関連発がんにおける酸化・ニトロ化 DNA 損傷: その役割と意義、日本薬学会東海支部特別講演会、名古屋市、2012 年 1 月 24 日
4. Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 平工雄介, 多層カーボンナノチューブで処理したヒト肺上皮細胞におけるニトロ化 DNA 損傷、第 70 回日本癌学会総会、名古屋市、2011 年 10 月 3~5 日
5. 平工雄介, 酒井潔, 柴田英治, 上島通浩, 久永直見, 村田真理子, ヒト肺組織における酸化・ニトロ化 DNA 損傷と石綿曝露との関連、第 84 回日本産業衛生学会(優秀演題)、東京、2011 年 5 月 18~20 日
6. 平工雄介, 西川嘉広, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, ヒト肺上皮細胞におけるカーボンブラックナノ粒子によるニトロ化 DNA 損傷、第 11 回日本 NO 学会学術集会、町田市、2011 年 5 月 13~14 日
7. Hiraku Y. The role of nitrative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. International Symposium on Biodynamics in Host Defense, Tsu, Mie, Japan, 2011 年 1 月 24~25 日
8. Hiraku Y, Sakai K, Shibata E, Kamijima M, Hisanaga H, Ma N, Kawanishi S, Murata M. Workshop “Tumor microenvironment & Oncogenesis”, Formation of 8-nitroguanine, a

DNA lesion associated with inflammation-related carcinogenesis, in human lung in relation to asbestos exposure, The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, Kyoto, Japan, 2010 年 8 月 31 日~9 月 3 日

9. Hiraku Y, Ishiyama R, Matsunaga Y, Horibe Y, Ma N, Kawanishi S, Murata M. iNOS-mediated DNA damage induced by nanoparticles: 8-nitroguanine formation in cultured cells treated with carbon black, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan, 2010 年 6 月 14~18 日
10. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in inflammation-related carcinogenesis, 4th International Conference on Oxidative/Nitrosative Stress and Disease, New York, USA, 2009 年 10 月 28~30 日
11. 平工雄介, 市瀬孝道, 馬寧, 吉田成一, 定金香里, 村田真理子, 川西正祐, シンポジウム「NO と発がん・がん治療への応用」アスベスト曝露マウスの肺組織におけるニトロ化 DNA 損傷、第 9 回日本 NO 学会学術集会、静岡市、2009 年 5 月 8~9 日

[図書] (計 6 件)

1. Hiraku Y. Role of chronic inflammation and resulting DNA damage in cervical carcinogenesis induced by human papillomavirus, In: *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects*, Broeck DV (ed.), InTech, pp. 359-382 (2012)
2. Hiraku Y, Kawanishi S. Prognostic significance of nitrative DNA damage in infection- and inflammation-related carcinogenesis, In: *Nitric Oxide and Cancer: Prognosis, Prevention and Therapy*, Bonavida B (ed.), Springer, pp. 341-360 (2010)
3. 平工雄介, 川西正祐, II-6 悪性腫瘍、d. 感染・炎症関連発がん、改訂版分子予防環境医学(分子予防環境医学研究会 編)、本の泉社 418-425 (2010)
4. 平工雄介, 川西正祐, 3)物理化学的因子、4 発がん因子、腫瘍薬学 (川西正祐、中瀬一則、大井一弥 編)、南山堂、81-87 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30324510

(2) 研究分担者

村田 真理子 (MURATA MARIKO)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10171141

(3) 連携研究者

久永 直見 (HISANAGA NAOMI)
愛知教育大学・保健環境センター・教授
研究者番号：90111856

柴田 英治 (SHIBATA EIJI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：90206128

(4) 研究協力者

酒井 潔 (SAKAI KIYOSHI)
名古屋市衛生研究所・主任研究員