

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659432
 研究課題名（和文） 含鉄蛋白質に含まれるラジウムの体内被曝による悪性中皮腫発生機序に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） A basic study on malignant mesothelioma pathogenesis by internal radiation exposure of radium contained in the iron-containing protein
 研究代表者
 木浦 勝行 (KIURA KATSUYUKI)
 岡山大学・岡山大学病院・教授
 研究者番号：10243502

研究成果の概要（和文）：

健常雄性Slc:Wistarラット10匹に鉄およびキレート剤を腹腔内へ反復投与し、5匹で悪性腹膜中皮腫を認めたが、コントロール群、キレート剤投与群では認めなかった。免疫染色(Calretinin, CEA染色)、電子顕微鏡による観察を行い、いずれも上皮型中皮腫であることを確認した。また、DNA酸化損傷マーカーである8-hydroxy-2-deoxyguanosineによる免疫染色は陽性であり、従来の学説は確認された。ラジウムを含む微量元素を最終解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Ten healthy male Slc:Wistar rats were repeatedly injected (i. p.) with a chelating agent and iron. Five of 10 rats showed a malignant peritoneal mesothelioma, but no rats showed it in the control and the chelating agent administration group. The tumor cells were positively stained by Calretinin and CEA. The results of immunostaining and the findings by electron microscope indicated epithelial mesothelioma. In addition, immunostaining with 8-hydroxy-2-deoxyguanosine is a DNA oxidative damage marker was positive. Thus, the conventional theory was confirmed. The final analysis of trace elements including radium is ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌，悪性中皮腫，ラジウム，生体内被曝

1. 研究開始当初の背景

中皮腫を含む肺におけるさまざまな悪性腫瘍は、ある種の繊維や粒子による被ばくによって引き起こされるといわれているが、その発がんメカニズムはまだ十分に理解させていない。一方、鉄に富む物質（アスベストなど）の沈着がフェリチン発現を誘導し、含鉄小体（フェリチン小体）の形成、成長の中で微量元素が共沈およびさらに酸化的環境下

におけるフェリチン中のフェリハイドライドによる経時的微量元素の吸着が起り、ラジウムの「ホットスポット」が形成され、中皮腫発がんにかかわる可能性が見いだされている (Nakamura E et, al. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85. 2009)

2. 研究の目的

岡山大学地球物質科学研究センターの中村

栄三教授らは、微量元素パターンの解析で悪性中皮腫患者の肺から分離したフェリチンからなる含鉄蛋白質小体に環境生態系より高い濃度のラジウムを検出している。生体内にラジウム吸着によるホットスポットが形成され、そこから発せられる長期間の α 線により、細胞傷害あるいはDNA損傷を介して発癌を引き起こしている、すなわち“ラジウムの生体内被曝による癌化”という斬新で独創的な仮説を提唱している。本研究はこの仮説を検証するために動物実験を計画した。ラットを使用し、腹腔内に長期に鉄剤を注射することにより腹膜中皮腫を形成させ、自然界に存在するラジウムが腹膜中皮腫の含鉄小体に集積しホットスポットを形成するか否かを地球物理化学的・免疫組織学的・分子生物学的に検証する。また、アスベスト関連疾患の臨床検体を用いて、悪性胸膜中皮腫の癌遺伝子および癌抑制遺伝子のメチル化によるエピジェネティック変化が、腫瘍の進展に関与していることを報告している (Umemura S, Kiura K, et al. Carcinogenesis 29:2008)。従来からある学説はアスベストが取り込まれた細胞のアスベスト繊維表面から生じるフリーラジカル、あるいはマクロファージに繊維が不完全に貪食されて炎症が惹起された結果、炎症細胞から生じるフリーラジカルによるDNA損傷が発癌のイニシエーションとされている (Shukla A, et al. Free Rad Biol Med 34: 2003)。同時に、従来学説も検証する。

3. 研究の方法

1) 試験概要：基本的にはOkadaらの方法によりラット悪性中皮腫を作製し、解析する。3週齢の健常雄性Slc:Wistarラットを20匹購入し、7日間(入荷・検収日含む)馴化飼育する。馴化終了後、当日の体重を基に最も体重の小さい動物6匹を除外し、各群の体重平均値および標準偏差がほぼ等しくなるように、第1群2匹、第2群2匹、第3群10匹の計3群に群分けする。除外された6匹の

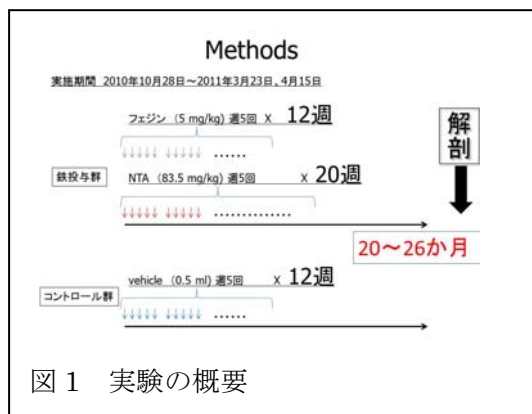


図1 実験の概要

動物のうち、一般状態に異常のみられない4

匹を無作為に選抜し、モニター動物として設定する。群分け後、各投与液を一定期間腹腔内投与した。概要を図1に示す。

2) 一般状態観察

試験期間中、動物の一般状態を毎日1日1回観察した。

3) 3群分け

群分け当日の体重を基に、最も体重の小さい動物6匹を除外し、各群の体重平均値および標準偏差がほぼ等しくなるように、第1群2匹、第2群2匹、第3群10匹の計3群に群分けする。除外された6匹の動物のうち、一般状態に異常のみられない4匹を無作為に選抜し、モニター動物として設定した。

4) 体重測定

測定回数：投与開始日から7日毎に、動物別に測定する。測定値は小数点以下第一位までとした。

測定機器：株式会社A&D製上皿電子天秤

FY-3000

5) 投与

投与経路：腹腔内

投与回数：1日1回、週5回の反復投与(媒体およびNTA：20週間、Fe：12週間)

投与用量：Fe 5 mg/kg, NTA 83.5 mg/kg

投与容量：媒体 0.5 mL/animal, Fe:2.5 mL/kg, NTA:1.0 mL/kg

投与方法：動物を無麻酔下で手保定し、1 mL シリンジ(テルモ株式会社製)と25G注射針(テルモ株式会社製)を使用して、動物の腹腔内に投与した。なお、第3群については、Feを投与後にNTAを投与した。

6) 生後20-26か月で、ラットをsacrificeし、腹膜中皮腫を摘出する。1/3は岡山大学地球物質科学研究センターに送付し、1/3はホルマリン処置後パラフィン包埋(組織学検討用)、1/3は凍結保存(分子生物学的検討用)した。

4. 研究成果

鉄およびキレート剤を反復投与した10匹のラットのうち、5匹で悪性腹膜中皮腫が確認された(図1)。コントロール群2匹(生理食塩水を腹腔内投与)、キレート剤投与群2匹(キレート剤を腹腔内投与)においては悪性腹膜中皮腫を認めなかった。得られた悪性腹膜中皮腫検体は免疫染色(Calretinin, CEA等)を使用(図3)、電子顕微鏡による観察(図6)を行い、いずれも上皮型であることを確認した。また、DNA酸化損傷マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)による免疫染色(図5)を行い、得られた悪性腹膜中皮腫においてはDNA酸化損傷がおこなっていることを確認した。

今後はラジウムを含む微量元素および走査

型電子顕微鏡による最終解析中である。

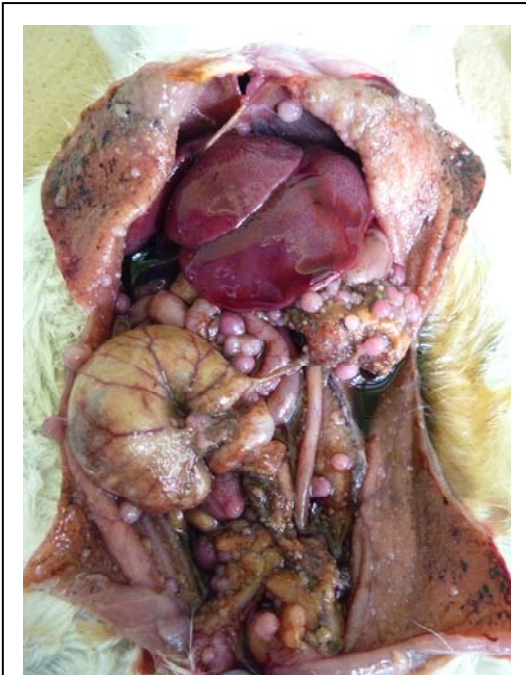


図2 Fe剤とキレート剤投与後, 腹腔・腹膜に顆粒状の多数の腫瘍を認める。

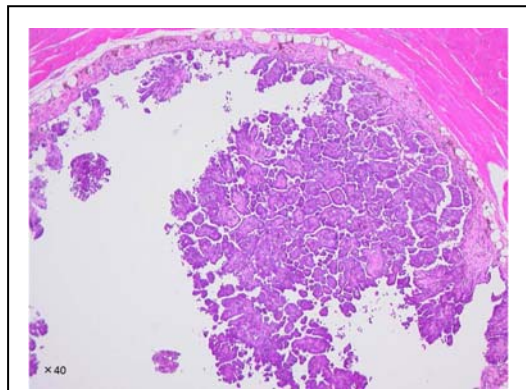


図3 HE染色

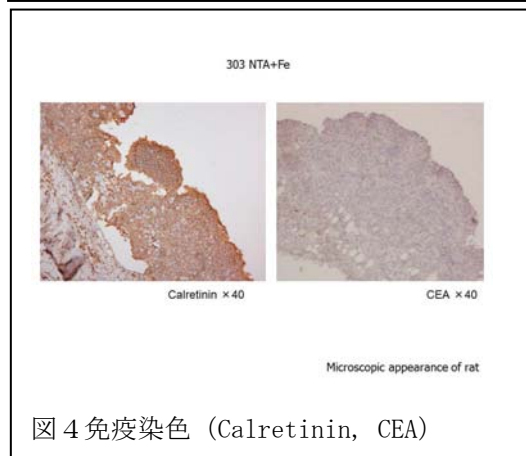


図4免疫染色 (Calretinin, CEA)

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
8-OHdG(DNA酸化損傷マーカー)

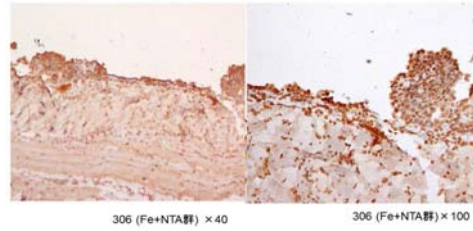


図5 DNA酸化損傷マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)による免疫染色

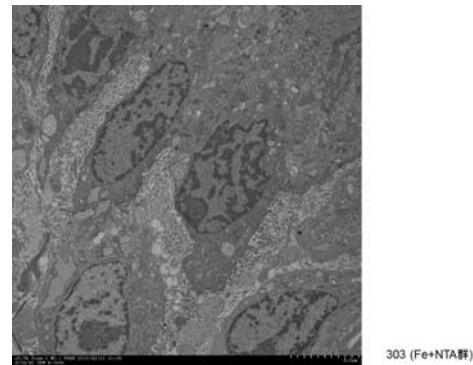
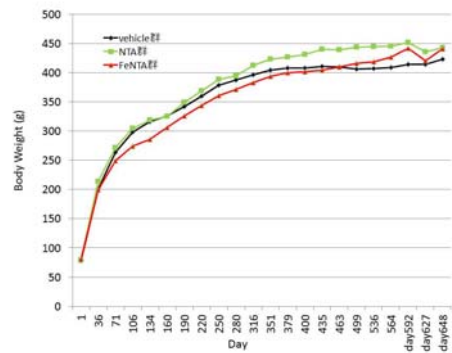


図6 電子顕微鏡写真: 細胞表面全体に微絨毛(microvilli)の発育が目立ち, 悪性中皮腫が考えられた。



補足: 鉄剤投与中のラットの体重変化を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

- ① Fujii M, Fujimoto N, Hiraki A, Gemba K, Aoe K, Umemura S, Katayama H, Takigawa N, Kiura K, Tanimoto M, Kishimoto T. Aberrant DNA methylation profile in pleural fluid for differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* (査読有) 103(2012)510-514.
doi:
10.1111/j.1349-7006.2011.02180.x.
- ② Ueno T, Tsukuda K, Toyooka S, Ando M, Takaoka M, Soh J, Asano H, Maki Y, Muraoka T, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamatsuji T, Kiura K, Naomoto Y, Miyoshi S. Strong anti-tumor effect of NVP-AUY922, a novel Hsp90 inhibitor, on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* (査読有) 76(2012)26-31.
doi: 10.1016/j.lungcan.2011.09.011.
- ③ Ogata Y, Aoe K, Hiraki A, Murakami K, Kishino D, Chikamori K, Maeda T, Ueoka H, Kiura K, Tanimoto M. Is adenosine deaminase in pleural fluid a useful marker for differentiating tuberculosis from lung cancer or mesothelioma in Japan, a country with intermediate incidence of tuberculosis? *Acta Med Okayama.* (査読有) 65(2011)259-263.
- ④ Takigawa N, Kiura K, Kishimoto T. Medical treatment of mesothelioma: anything new? *Curr Oncol Rep.* (査読有) 13(2011)265-271.

doi: 10.1007/s11912-011-0172-1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木浦 勝行 (KIURA KATSUYUKI)
岡山大学・岡山大学病院・教授
研究者番号: 10243502

(2) 研究分担者

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60325107

市原 英基 (ICHIHARA EIKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 40549705

(3) 連携研究者

中村 栄三 (NAKAMURA EIZO)
岡山大学・地球物質科学研究センター・教授
研究者番号: 80201672

吉野 正 (YOSHINO TADASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70183704

高田 穰 (TAKATA MINORU)

京都大学・放射線生物研究センター・教授
研究者番号: 30281728