

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08787

研究課題名(和文) ニトロ化DNA損傷の低侵襲性定量解析法の開発と炎症関連発がんリスク評価への応用

研究課題名(英文) Development of minimal-invasive and quantitative analytical method for nitrated DNA damage, and its application to risk assessment of inflammation-related carcinogenesis

研究代表者

川西 正祐 (Kawanishi, Shosuke)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10025637

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)：慢性感染や炎症は極めて重要な発がん要因である。炎症が発がんに寄与する割合は、約25%以上と推算されており、炎症関連発がんリスクの早期評価と予防法確立が急務である。我々は、炎症に特異的に生成するニトロ化DNA損傷塩基の8-ニトログアニンが、がん好発部位で発がんに先駆けて生成し、新規バイオマーカーとして有望であることを明らかにしてきたが、フィールド調査や予防介入研究に実用可能な定量解析法がない。本研究では、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)を用いて8-ニトログアニンを定量する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection and inflammation have been recognized as important factors for carcinogenesis. Inflammation is estimated to contribute to approximately 25% of human cancers. It is urgent problem to be solved, the risk assessment in early phase and prevention of inflammation-related carcinogenesis. We have reported that 8-nitroguanine, nitrative DNA damage specifically generated under inflammation, is generated in cancerous site before carcinogenesis. Therefore, 8-nitroguanine is hopeful marker for risk assessment of inflammation-related carcinogenesis. However, it is difficult to analyze 8-nitroguanine with quantitatively and minimal-invasiveness. In this study, we succeeded to confirm the amount of 8-nitroguanine quantitatively with using high performance liquid chromatography coupled with an electrochemical detector (HPLC-ECD).

研究分野：衛生学

キーワード：がん予防 炎症 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

慢性感染や炎症は極めて重要な発がん要因である。全世界の発がんの約 18% が感染症に起因する。日本では、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染による子宮頸癌、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染による肝癌、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) 感染による胃癌などが大きな課題である。さらに潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性疾患やアスベストなどの発がん物質においても、炎症が発がんを促進する。総じて炎症が発がんに寄与する割合は、約 25% 以上と推算されており、炎症関連発がんリスクの早期評価と予防法確立が急務である。

一酸化窒素 NO がスーパーオキシド O_2^- 存在のもとで DNA 塩基のひとつであるグアニンと反応して 8-ニトログアニンを生成することは、化学反応としては知られている。我々は、生体内においても、炎症部位で産生する NO などの活性酸素・窒素種によって 8-ニトログアニンが生成することを、明らかにしてきた。すなわち、胆管癌を引き起こすタイ肝吸虫では、感染ハムスターの胆管に 8-ニトログアニンが著明に生成すること (BBRC 2003, *Carcinogenesis* 2004, *Int J Parasitol* 2005)、タイ肝吸虫感染者・がん患者の尿では酸化 DNA 損傷が増加し、駆虫により改善すること (*Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2008) を発見した。また、8-ニトログアニンがグアニンからチミンへの変異を誘発することを示した (*Biol. Chem.* 2006, *Antioxid. Redox Signal.* 2006)。したがって、炎症による変異とそれに続く発がんにおいて 8-ニトログアニンが重要であるということを証明した。

さらに、患者病理組織を用いた研究により、HPV 感染 (*Cancer Sci.* 2007)、ピロリ菌感染 (BBRC 2004)、HCV 感染 (*J Hepatol.* 2005)、EB ウイルス感染 (*Int J Cancer.* 2008) において、8-ニトログアニンが発がんに先駆けて

がん好発部位で生成することを明らかにした (*Oxid Med Cell Longev.* 2013)。感染症以外にも、バレット食道炎、アスベスト曝露などの、発がんに至る慢性炎症患者で、8-ニトログアニンを各々発症部位で検出している (*J Occup Health.* 2014, BBRC 2012)。

以上のように、突然変異誘発性の 8-ニトログアニンは、炎症関連発がんに有効な新規バイオマーカーとなりうる。バイオマーカーとして実用化するためには、侵襲性の低い尿・血液を用いる解析法が望ましい。しかし、これまでの研究は組織を用いた解析が主であり、尿・血液については簡便かつ信頼性の高い定量解析法は確立されていないため、ほとんど解析が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトにおける炎症関連発がんリスク評価への応用を目的として、フィールド調査や予防介入研究に活用できる低侵襲性の尿・血液の測定法を開発する。8-ニトログアニン抗体は、既に作製しているポリクローナル抗体と、新たに作製するモノクローナル抗体を用いて、高感度定量測定ができる ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を構築し、プロトコールを最適化して、簡便かつ信頼性の高い解析法を確立する。特異性の高い抗原抗体反応を利用することにより、夾雑物の多い生体試料中に含まれる超微量の 8-ニトログアニンを測定できるというアイデアである。さらに ELISA 解析プロトコールを最適化して感度を高める。

これまでの研究成果から 8-ニトログアニン生成が予測される、感染・炎症関連がん患者とハイリスク患者 (HPV 感染、食道炎、寄生虫感染、大腸炎) より、疾病局部の生検組織・手術標本と、全身を反映する尿・血液を採取する。組織化学的手法による疾病局所の解析結果、本研究で開発した ELISA 法による全身を反映する尿・血液の解析結果および

臨床所見との相関を検討し、8-ニトログアニンの定量解析法が予防介入研究に有用であり、応用可能であることを示す。

3. 研究の方法

(1) 炎症関連がん患者・ハイリスク患者の生体試料収集

インフォームドコンセントを得て、HPV 感染患者・子宮頸癌患者、バレット食道患者・食道癌患者、HCV 感染患者・肝癌患者、タイ肝吸虫感染患者・胆管癌患者、潰瘍性大腸炎患者・大腸癌患者、および各前がん病変患者から、生検組織・手術検体・尿・血液を採取した。

(2) 炎症関連がん患者・ハイリスク患者の臨床データ解析

(3) 8-ニトログアニン生成の組織レベルでの解析

(1)で得た組織標本を用いて免疫組織染色を行い、8-ニトログアニンの生成部位と炎症像の関係を検討し、癌部と非癌部の所見を比較する。8-ニトログアニンと病期、病理所見、臨床所見の関係を検討する。

(4) ELISA の構築と解析、プロトコル最適化

8-ニトログアニンのマウスモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を用いて、サンドイッチ ELISA プレートを構築する。

血清、血漿中の DNA 断片を DNA Extractor SP Kit で抽出し、DNA 濃度を測定する。尿は緩衝液で pH を調整した後、フィルターろ過し、クレアチニン濃度を測定する。

b.試料中の 8-ニトログアニン量を ELISA で解析し、マイクロプレートリーダー (Spectra Max M5) で測定する。内部標準として尿中クレアチニン、血中アルブミンなどを検討する。

生体試料前処理のプロトコルを最適化する。二次抗体の検出用標識物質を検討し、感度を改善する (PAP 複合体, 蛍光標識, HRP 酵素化学発光による検出など)。

8-ニトログアニンの競合 ELISA プレートを構築する。

尿・血液の 8-ニトログアニンを ELISA にて定量し、さらにプロトコルを最適化する。

(5) 解析結果の統合と最適化

病期やがん進行度と 8-ニトログアニン量の相関を検証する。免疫組織化学的手法と比較検証する。定量性と簡便性のバランスを最適化し、予防介入研究に応用できるか総合的に評価する。8-ニトログアニンが炎症関連がんリスクのマーカーとして有効であることを証明する。

4. 研究成果

平成 27 年度は、微量 8-ニトログアニンを抗体を利用して検出するため、8-ニトログアニンのウサギポリクローナル抗体を作製して 96 穴プレートに固相化し、サンドイッチ ELISA プレートを構築した。またヒト試料を用いて解析を試みるため、炎症関連がん患者およびハイリスク患者の生体試料収集を行った。具体的には、インフォームドコンセントを得て、タイ肝吸虫感染患者・胆管癌患者、潰瘍性大腸炎患者・大腸癌患者、および各前がん病変患者から、生検組織・手術検体を採取した。得られた生検組織はホルマリン固定・パラフィン包埋した後、免疫組織染色を行い、8-ニトログアニンの生成を確認した。

平成 28 年度は、8-ニトログアニンのマウスモノクローナル抗体 (市販) とウサギポリクローナル抗体 (自作) を用いてサンドイッチ ELISA プレートを構築し、ELISA 構築条件の最適化を試みた。しかし、検出感度が当初想定より低く、予定どおりに解析は進まな

かった。

当初計画していた ELISA の解析は感度が不十分であることと、使用する抗体が高額であるため、平成 29 年度は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて試料中 8-ニトログアニンの定量を試みた。炎症モデルとして一酸化窒素とスーパーオキシドの同時発生試薬である 3-(4-Morpholinyl)sydnonimine, hydrochloride (SIN-1) を用いた。仔牛胸腺 DNA を SIN-1 と反応させた後、抽出した DNA を酵素的にヌクレオシドに分解し、処理した後、HPLC-ECD で測定し、dG 量に対する 8-ニトログアニン量を定量解析した。その結果、反応させた SIN-1 量に依存して 8-ニトログアニン生成量が増加する現象を、HPLC-ECD で定量的に確認することに成功した。今後はヒト試料を用いた測定を行うため、試料中の夾雑物による測定への影響について、解析を進める予定である。

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)

[雑誌論文](計 9 件)

Nitrative Stress and Tau Accumulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex (ALS/PDC) in the Kii Peninsula, Japan. Hata Y, Ma N, Yoneda M, Morimoto S, Okano H, Murayama S, Kawanishi S, Kuzuhara S, Kokubo Y. Front Neurosci. 2018 Jan 22;11:751. doi: 10.3389/fnins.2017.00751.

Nitrative DNA damage in cultured macrophages exposed to indium oxide. Afroz T, Hiraku Y, Ma N, Ahmed S, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M.

J Occup Health. 2018 Mar 27;60(2):148-155. doi: 10.1539/joh.17-0146-OA.

Gene expression profiling of hepatocarcinogenesis in a mouse model of chronic hepatitis B. Nosaka T, Naito T, Hiramatsu K, Ohtani M, Nemoto T, Marusawa H, Ma N, Hiraku Y, Kawanishi S, Yamashita T, Kaneko S, Nakamoto Y. PLoS One. 2017 Oct 2;12(10):e0185442. doi: 10.1371/journal.pone.0185442.

Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Int J Mol Sci. 2017 Aug 19;18(8). pii: E1808. doi: 10.3390/ijms18081808.

Nitrative DNA damage induced by carbon-black nanoparticles in macrophages and lung epithelial cells. Hiraku Y, Nishikawa Y, Ma N, Afroz T, Mizobuchi K, Ishiyama R, Matsunaga Y, Ichinose T, Kawanishi S, Murata M. Mutat Res. 2017 Jun;818:7-16. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.04.002.

Nitrative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Genes Environ. 2017 Jan 1;38:26. doi: 10.1186/s41021-016-0055-7.

Inflammation-Related DNA Damage and Cancer Stem Cell Markers in Nasopharyngeal Carcinoma. Wang S, Ma N, Zhao W, Midorikawa K, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S,

Zhang Z, Huang G, Murata M. Mediators Inflamm. 2016;2016:9343460. doi: 10.1155/2016/9343460.
DNA Damage in CD133-Positive Cells in Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. Thanan R, Ma N, Hiraku Y, Iijima K, Koike T, Shimosegawa T, Murata M, Kawanishi S. Mediators Inflamm. 2016;2016:7937814. doi: 10.1155/2016/7937814.
Multi-walled carbon nanotube induces nitrative DNA damage in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. Hiraku Y, Guo F, Ma N, Yamada T, Wang S, Kawanishi S, Murata M. Part Fibre Toxicol. 2016 Mar 29;13:16. doi: 10.1186/s12989-016-0127-7.

[学会発表](計 8件)

大西志保、馬寧、村田真理子、平工雄介、及川伸二、川西正祐. 膀胱がん患者組織における炎症関連DNA損傷とCOX2. 日本薬学会第138年会(金沢) 2018.3.25-28
大西志保・馬寧・村田真理子・平工雄介・及川伸二・川西正祐. 膀胱がん患者組織における炎症関連因子とDNA損傷. 第88回日本衛生学会(東京) 2018.3.23
大西志保、馬寧、村田真理子、平工雄介、川西正祐. がん発生・悪性化における炎症関連DNA損傷と抗炎症薬の作用機序. 第17回分子予防環境医学研究会 2018.2.2-3. (三重)
大西志保、馬寧、村田真理子、平工雄介、及川伸二、小林果、川西正祐. 寄生虫

感染による膀胱癌患者組織における炎症関連DNA損傷とCOX2発現. 第87回日本衛生学会学術総会、フェニックスシーガイアリゾート シーガイアコンベンションセンター(宮崎市) 20017.3.28

大西志保、馬寧、村田真理子、平工雄介、及川伸二、川西正祐. ビルハルツ住血吸虫がもたらす膀胱発がんにおける炎症関連DNA損傷とCOX-2の役割. 第76回日本癌学会学術総会(横浜) 2017.9.28-30

平工雄介、Tahmina Afroz、馬寧、川西正祐、村田真理子. インジウム化合物に曝露した培養細胞におけるニトロ化DNA損傷. 日本産業衛生学会東海地方会(浜松市) 2016.11.12

平工雄介、馬寧、王淑民、川西正祐、村田真理子. 多層カーボンナノチューブで処理した肺上皮細胞におけるニトロ化DNA損傷: Toll様受容体9の役割. 第74回日本癌学会学術総会(名古屋市) 2015.10.8-10.

Wang S, Ma N, Kawanishi S, Zhao W, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang G, Murata M. Inflammation-related DNA damage in relation to the expression of cancer stemness markers in human nasopharyngeal carcinoma. SFRR-E/SNFS Meeting Stuttgart 2015: Redox Biology Meets Nutrition (Germany) 2015.9.1-4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川西 正祐 (KAWANISHI, Shosuke)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号: 10025637

(2)研究分担者

大西 志保 (OHNISHI, Shiho)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：80511914

(3)連携研究者

馬 寧 (MA, Ning)

鈴鹿医療科学大学・医療科学研究科・教授

研究者番号：30263015

田畑 務 (TABATA, Tsutomu)

三重大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40252358

飯島 克則 (IJIMA, Katsunori)

秋田大学・医学研究科・教授

研究者番号：60375003

(4)研究協力者

村田 真理子 (MURATA, Mariko)

三重大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：10171141