

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590585  
 研究課題名（和文）繊維・粒子状物質による呼吸器疾患のニトロ化DNA損傷を指標としたリスク評価  
 研究課題名（英文）Risk assessment of pulmonary diseases caused by fibers and particles using nitrative DNA lesion as a potential biomarker  
 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：

繊維・粒子状物質による発がんなどの呼吸器疾患には、慢性炎症が重要な役割を果たすと考えられる。8-ニトログアニンとは、炎症条件下で生成される変異誘発性 DNA 損傷塩基である。我々はアスベストを気管内投与したマウスの気道上皮で 8-ニトログアニンが生成され、アスベストの発がん性の強さを反映するという注目すべき知見を得た。また感染・炎症関連発がん患者の臨床検体を用いた研究から、8-ニトログアニン生成は慢性炎症からがんの発生・進展に至る過程を反映し、発がんリスクを評価するバイオマーカーとして応用可能であることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,200,000	1,260,000	5,460,000

研究分野：衛生学

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、アスベスト、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

近年、アスベスト、ディーゼル排気微粒子、黄砂などの繊維・粒子状物質による健康障害が重大な社会問題となっている。繊維・粒子状物質のうち、国際がん研究機関 (IARC) はアスベストと結晶質シリカを group 1 (ヒトに発がん性を有する)、ディーゼル排

気微粒子を group 2A (ヒトに発がん性を有する可能性が高い)、ナノ素材として使用されるカーボンブラックと酸化チタンを group 2B (ヒトに発がん性を有する可能性がある) と評価している。

(1) アスベスト：2005年、クボタがアスベストの曝露を受けた労働者に加え、工場周辺の住民にも悪性中皮腫を引き起こしたこ

とを明らかにし、アスベストによる健康障害について社会的に大きな関心と呼んだ。アスベスト曝露から発がんには数十年という長い期間を要することから、今後我が国における中皮腫や肺癌による死者数の増加が強く懸念される。発がん機構には不明な点が多いが、肺組織における機械的刺激や慢性炎症が重要な役割を果たすと考えられる。

(2)黄砂：中国大陸より飛来する黄砂による健康障害は近年深刻である。韓国や台湾では、黄砂期間中に循環器・呼吸器系疾患による死亡が増加した。日本でも黄砂飛来時に咳、痰、目の粘膜や皮膚などの症状を訴えるケースが増えている。黄砂にはシリカが含まれており、中国では砂漠の近くの住民に塵肺症のような病的変化が認められている。

(3)ナノ素材：近年、工業・医療分野への応用を目的として種々のナノ素材(人為的に生産される直径 100 nm 以下の微粒子)が生産されているが、ヒトへの安全性についてはほとんど解明されていない。

繊維・粒子状物質は一度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病態が進行する可能性がある。したがって、アスベストに代表されるように、既に曝露を受けた個人の呼吸器疾患リスクの評価法および予防法の開発が急務である。さらにアスベスト代替繊維やナノ素材のように、産業応用を目的とした新規繊維・粒子状物質のヒトへの安全性の予知法の開発も必要である。

## 2. 研究の目的

本課題では繊維・粒子状物質による慢性炎症を介したニトロ化 DNA 損傷を指標として、呼吸器障害、特に発がんの分子機構を解明し、その知見を基盤として繊維・粒子状物質の曝露を受けた個人の呼吸器疾患のリスクを早期に評価し、さらに産業応用の可能性のある新規物質がヒトに健康障害をもたらす危険性を予知する評価システムの構築を目的とする。

8-ニトログアニンとは、炎症条件下で生成される変異誘発性 DNA 損傷塩基である(図 1)。本研究では、ヒトに呼吸器疾患を起こすことが明らかな、あるいはその可能性が強く懸念されるアスベスト、黄砂などの繊維・粒子状物質を気管内投与した実験動物モデルを作製する。動物から肺組織を得て、8-ニトログアニンなどの DNA 損傷塩基の生成について免疫組織学的に解析する。また炎症およびがん関連遺伝子発現の解析を行い、8-ニトログアニン生成との関連を解析する。上記の研究をもとに、炎症から発がん

に至る分子機構を解明し、呼吸器疾患リスクの評価に応用できる新規バイオマーカーを確立する。

さらに繊維・粒子状物質をマクロファージおよび肺胞上皮細胞などの培養細胞に添加して呼吸器疾患のモデルを作成する。このモデルを用いて、繊維・粒子状物質による DNA 損傷性を解析し、産業応用の可能性のある新規繊維・粒子状物質が呼吸器疾患を起こすリスクを事前に予知するシステムを構築する。本課題では、以上の実験で得た知見を繊維・粒子状物質による健康障害の予防に応用するための基盤を確立する。

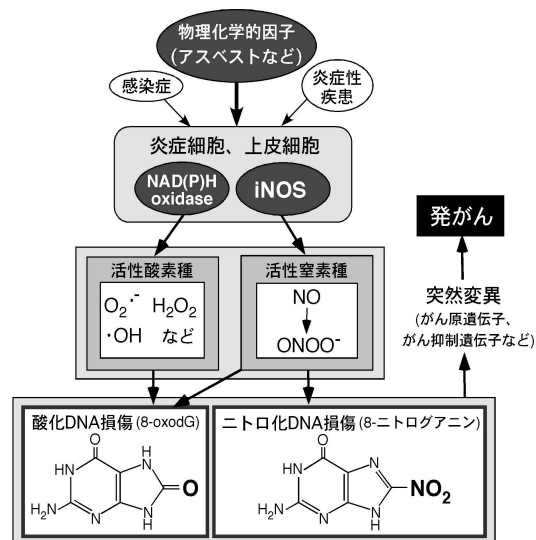


図1 炎症関連発がんにおける酸化・ニトロ化DNA損傷塩基の生成

## 3. 研究の方法

(1)繊維・粒子状物質の動物への投与：マウスにアスベスト(クリソタイル(白石綿)あるいはクロシドライト(青石綿))、黄砂(中国の砂漠で採取し粒径10 μm以下に精製。350°Cで加熱処理して表面のグラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)を不活化。)などを気管内投与し、肺疾患モデル動物を作製する。

(2)抗 8-ニトログアニン抗体の作製：高感度かつ特異的な抗 8-ニトログアニンポリクローナル抗体は申請者が報告した方法(Nitric Oxide 2004)を用いて作製する。8-ニトログアノシンとウサギ血清アルブミンの複合体をアジュバントと共にウサギに皮下注射する。血液を採取し 8-ニトログアニンで固定したアフィニティーカラムを用いて抗体を精製する。

(3) 8-ニトログアニンの局在の検討：上記で得た抗体を用いて免疫組織染色を行い、動物の肺組織における 8-ニトログアニンおよび酸化的 DNA 損傷の指標である 8-オキシ

デオキシグアノシン(8-oxodG)の生成部位を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で解析する。特に、癌化しやすい気管支上皮細胞における DNA 損傷に注目する。8-ニトログアニンの相対的生成量を染色所見から画像解析ソフトを用いて定量化する。

(4)細胞内 DNA 損傷の検討：マクロファージおよび気道上皮の培養細胞に種々の繊維・粒子状物質を投与して一定時間培養後、免疫細胞染色を行い、8-ニトログアニンの生成について蛍光顕微鏡で観察する。

(5)炎症・がん関連分子の解析：動物の肺組織や培養細胞を用いて、種々の炎症関連蛋白、特に誘導型 NO 合成酵素(iNOS)の発現およびその過程に関わる転写因子(NF-κB など)の活性化について、免疫組織染色、ウェスタンブロッティング法で解析する。

(6)8-ニトログアニンの新規バイオマーカーとしての応用：上記の研究により得た結果を総合し、8-ニトログアニンおよびその生成に関わる分子を指標とした、繊維・粒子状物質による呼吸器疾患のリスク評価法を確立する。

#### 4. 研究成果

(1)アスベスト：アスベストを気管内投与したマウスの肺組織を得て免疫組織染色を行った結果、8-ニトログアニンおよび 8-oxodG は主に気管支上皮細胞で生成された。RNA 分解酵素を用いると 8-ニトログアニンの染色は核でより明瞭に認められ細胞質では消失したことから、8-ニトログアニンは RNA のみならず核 DNA で生成されることが判明した。iNOS および NF-κB 発現も気管支上皮細胞で認められた。特に NF-κB の発現は核で認められたことから、核移行に伴う活性化が示唆された。画像解析の結果、8-ニトログアニン、8-oxodG、iNOS、NF-κB はいずれも、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)で気道上皮における染色性が有意に強かった。iNOS および NF-κB については、ウェスタンブロッティング法でも同様の結果を得た。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 損傷および iNOS 発現の強さと合致するという結果は大変意義深い。以上の結果から、アスベスト曝露により肺組織で慢性炎症が惹起され、NF-κB 依存性の iNOS 発現を介して、炎症細胞および上皮細胞から活性酸素・窒素種が産生され、8-ニトログアニンが生成されて発がんに関与すると考えられる。8-ニトログアニンおよびその生成過程に関わる分子はアスベスト曝露などによる炎症関連発がんの早期リスク評価を目的とした新規バイオマーカーとして応用できる

ことが期待される。

(2)黄砂：中国の砂漠で採取された黄砂およびアリゾナ(米国)で採取された砂を気管内投与したマウスより肺組織を得て免疫組織染色を行った結果、気道上皮細胞で 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の生成を認めた。また、iNOS 発現および NF-κB 活性化も認められた。また、黄砂の加熱処理により表面に付着している LPS を除去した場合としなかった場合のいずれでも肺組織における DNA 損傷を認めたことから、微生物成分を含まない粒子にも DNA 損傷性を有することが明らかになった。

(3)ナノ素材：ナノ素材(カーボンブラック、カーボンナノチューブ)は液体中で非常に凝集しやすい。したがって、培養細胞を用いる実験に先立って、ナノ素材を細胞培地中で懸濁して超音波処理で凝集体を分散し、遠心沈降で粗大粒子を除去してナノサイズに調製する条件を確立した。これらのナノ素材をマクロファージおよび気道上皮の培養細胞に添加して免疫細胞染色を行った結果、細胞内で 8-ニトログアニンの生成を認めた。

(4)その他：種々の感染・炎症関連発がんの臨床検体において以下の成果を得た。

①ヒトパピローマウイルス(HPV)：HPV 感染による子宮頸部異形成患者の生検標本において、8-ニトログアニン生成が異形成細胞の分布に一致して認められ、その強さは異形成のグレードに有意に相関することを明らかにした(*Cancer Sci.* 2007)。

②Epstein-Barr ウイルス(EBV)：EBV 感染は、特に中国東南部では上咽頭癌の危険因子である。本研究では中国・広西医科大学との共同研究を行い、患者の生検標本を用いた実験から、8-ニトログアニンの生成は、EB ウイルス感染のない咽頭炎、感染を有する咽頭炎、上咽頭癌の順に有意に強くなることを明らかにした(*Int. J. Cancer*, 2008)。

③8-ニトログアニンとがん患者の予後：軟部腫瘍はしばしば炎症細胞の浸潤を伴う。軟部腫瘍患者の手術標本を用いた実験から、8-ニトログアニンの生成の強い群では、患者の生存期間が有意に短縮することを明らかにした(*Cancer Sci.* 2007)。

以上の結果から、8-ニトログアニンは種々の環境因子による慢性炎症からがんの発生・進展に至るリスクおよびがん患者の予後をも評価する有効なバイオマーカーになりうることを明らかにした。繊維・粒子状物質による疾病は慢性炎症を基盤として生じると考えられるため、8-ニトログアニンは現有の物質のみならず、今後新たに開発・生産される物質(アスベスト代替繊維やナノ素材など)の疾病リスクの予知に応用可能であることが期待される。

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 15 件)

1. Prakobwong, S., Hiraku, Y. (他 4 名、6 番目) Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, cytokines and collagen in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury, *Int. J. Parasitol.* (印刷中)(査読有)
2. Pinlaor S, Hiraku Y (他 5 名、7 番目) Curcumin reduces oxidative and nitrate DNA damage through balancing of oxidant-antioxidant status in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*, *Mol. Nutr. Food Res.* (印刷中)(査読有)
3. Oikawa S, Hiraku Y (他 8 名、7 番目) Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* (印刷中)(査読有)
4. Kobayashi H, Hiraku Y (他 5 名、5 番目) The mechanisms of oxidative DNA damage and apoptosis induced by norsalsolinol, an endogenous tetrahydroisoquinoline derivative associated with Parkinson's disease, *J. Neurochem.* **108**: 397-407 (2009)(査読有)
5. Thanan R, Hiraku Y (他 8 名、7 番目) Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **17**: 518-524 (2008)(査読有)
6. Pinlaor S, Hiraku Y (他 9 名、3 番目) Oxidative and nitrate stress in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters: an indirect effect after praziquantel treatment, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**: 564-573 (2008)(査読有)
7. Ma N, Hiraku Y (他 8 名、3 番目) Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: The relation to STAT3 activation and EGFR expression, *Int. J. Cancer* **122**: 2517-2525 (2008)(査読有)
8. Iwamoto T, Hiraku Y, Okuda M, Kawanishi S, Mechanism of UVA-dependent DNA damage induced by an antitumor drug dacarbazine in relation to its photogenotoxicity, *Pharm. Res.* **25**: 598-604 (2008)(査読有)
9. Tazawa H, Hiraku Y (他 8 名、6 番目) Oxidative and nitrate stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53<sup>+/+</sup> mice, *Carcinogenesis* **28**: 191-198 (2007)(査読有)
10. Ito K, Hiraku Y, Kawanishi S, Photosensitized DNA damage induced by NADH: site specificity and mechanism, *Free Radic. Res.* **41**: 461-468 (2007)(査読有)
11. Hoki Y, Hiraku Y (他 5 名、3 番目) 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer, *Oncol. Rep.* **18**: 1165-1169 (2007)(査読有)
12. Hoki Y, Hiraku Y (他 7 名、2 番目) iNOS-dependent DNA damage in patients with malignant fibrous histiocytoma in relation to prognosis, *Cancer Sci.* **98**: 163-168 (2007)(査読有)
13. Hiraku Y, Tabata T (他 4 名、1 番目) Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection, *Cancer Sci.* **98**: 964-972 (2007)(査読有)
14. Hiraku Y, Ito K, Hirakawa K, Kawanishi S, Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism, *Photochem. Photobiol.* **83**: 205-212 (2007)(査読有)
15. Fukuhara K, Hiraku Y (他 8 名、5 番目) 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 3869-3873 (2007)(査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 平工雄介、感染・炎症関連発がんにおける DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成とその意義、奨励賞受賞講演、第 79 回日本衛生学会総会、東京、2009 年 3 月 29 日～4 月 1 日
2. 平工雄介 他、Metal-mediated DNA damage induced by methylene blue in relation to the carcinogenicity (メチレンブルーによる金属依存性 DNA 損傷：発がん性との関連)、日本環境変異原学会第 37 回大会、宜野湾、2008 年 12 月 4～5 日
3. 平工雄介 他、Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients with EBV-associated naso-pharyngeal carcinoma (EB ウイルス感染による上咽頭癌患者におけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成)、第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28～30 日
4. Yusuke Hiraku 他、Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients infected with oncogenic viruses, HPV and EBV, The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Austria,

August 24-28, 2008

5. 平工雄介、村田真理子、アスベスト曝露マウス肺における DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成(第 2 報) 免疫組織化学法における染色性の定量的解析、第 81 回日本産業衛生学会、札幌、2008 年 6 月 24~27 日
6. 平工雄介 他、EB ウイルス感染による上咽頭癌患者におけるニトロ化 DNA 損傷、第 8 回日本 NO 学会学術集会、仙台、2008 年 5 月 9~10 日
7. 平工雄介、川西正祐、シンポジウム「分子予防・環境医学への新たな挑戦」感染・炎症関連発がんにおけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの役割、第 78 回日本衛生学会総会、熊本、2008 年 3 月 29~31 日
8. 平工雄介 他、Formation of 8-nitroguanine, a nitritative DNA lesion, in the lung of mice exposed to asbestos(アスベスト曝露マウス肺におけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成)、第 1 回アジア環境変異原学会・日本環境変異原学会第 36 回大会、北九州、2007 年 11 月 29~30 日
9. 平工雄介 他、アスベスト気管内投与マウスの肺組織における DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成、日本産業衛生学会東海地方会、名古屋、2007 年 11 月 17 日
10. 平工雄介 他、アスベスト気管内投与マウスの肺組織におけるニトロ化 DNA 損傷、第 7 回分子予防環境医学研究会、北九州、2007 年 10 月 26~27 日
11. 平工雄介 他、Nitritative DNA damage in the lung of asbestos-exposed mice (アスベスト曝露マウス肺におけるニトロ化 DNA 損傷)、第 66 回日本癌学会総会、横浜、2007 年 10 月 3~5 日
12. 平工雄介 他、LPS によるニトロ化 DNA 損傷の分子機構：感染・炎症関連発がんとの関連、第 7 回日本 NO 学会学術集会、大津、2007 年 5 月 17~18 日
13. 平工雄介 他、アスベスト曝露マウス肺における DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成、第 80 回日本産業衛生学会、大阪、2007 年 4 月 25~28 日

[図書] (計 2 件)

1. Hiraku Y, Kawanishi S, Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitritative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis, In: *Inflammation and Cancer-Methods and Protocols: Volume 2, Molecular Analysis and Pathways*, Kozlov SV (ed.), Humana Press, New York, NY, USA (印刷中)
2. 平工雄介、川西正祐、活性酸素・窒素種と DNA 損傷、化学フロンティア 18 ゲノム化学 (齋藤烈、杉山弘、中谷和彦 編)、化学同人、89-97, 2007

[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

なし

(3)連携研究者

なし