

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 6月1日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21390195

研究課題名（和文）

がん予防をめざした幹細胞がん化の分子機構の解明とバイオマーカーの開発

研究課題名（英文）

Cancer prevention study on the relationship of cancer stem cells biomarker and 8-nitroguanine in cancer tissues

研究代表者

川西 正祐（KAWANISHI SHOSUKE）

研究者番号：10025637

研究成果の概要（和文）：

ビルハルツ住血吸虫感染患者の膀胱癌では幹細胞/前駆細胞マーカーOct-4/3が発現し、変異誘発性DNA損傷塩基8-ニトログアニンの局在と一致した。食道がんの前がん病変バレット食道炎では、8-ニトログアニンと幹細胞マーカーGlypican-3が確認された。変異誘発性DNA損傷塩基と幹細胞マーカーの局在が一致する細胞が、前がん病変およびがん病変で確認できたことは、炎症関連発がんにおけるがん幹細胞の重要性を示している。

研究成果の概要（英文）：

8-Nitroguanine was formed in Oct3/4-positive stem cells in *S. haematobium*-associated cystitis and cancer tissues. 8-Nitroguanine and stem cell marker glypican-3 was observed in Barrett's esophagus tissues. In conclusion, inflammation by various factors may increase the number of mutant stem cells, in which nitrative DNA damage occurs, leading to tumor development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
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：8-ニトログアニン・8-oxodG・DNA損傷・炎症・感染・活性窒素種・バイオマーカー・がん予防

1. 研究開始当初の背景

国際がん研究機関(IARC)は感染症が全発がん要因の約18%を占めると推計している。先進国の中でも我が国は、感染症による発がん率が比較的高い。感染・炎症により組織が損傷を受けると、再生や修復のため幹細胞/前駆細胞が活性化する。これらの細胞には炎症細胞などから産生される活性酸素・窒素種によるDNA損傷およびタンパク質誘導や損傷がおこる。

8-ニトログアニンは炎症に特異的に生

成される変異誘発性のDNA損傷塩基である。我々は免疫組織学的手法を用いて、胆管細胞がんを起こすタイ肝吸虫、胃がんを起こすヘリコバクター・ピロリ菌、肝がんを起こすC型肝炎ウイルス、子宮頸がんを起こすヒトパピローマウイルスなど病原体が異なっても、8-ニトログアニンが発がん先に先駆けてがん好発部位で顕著に生成することを世界に先駆けて解明した。(Biol Chem. 2006, Antioxid Redox Signal 2006)。これらの知見から、8-ニトログアニンは、癌の進行度、浸潤および

患者の予後に関する有効なバイオマーカーとなる可能性を報告し(*Cancer Sci.* 2007 他)、現在この DNA 損傷マーカーに世界中が注目している。

最近、発がん機構においてがん幹細胞説が注目されている。自己再生能をもつ幹細胞/前駆細胞の異常は発がんに重大な影響を及ぼすため、発がん機序にもとづく予防戦略をたてるためには幹細胞のがん化機構の解析が不可欠である。

以上から、炎症関連の発がん過程で生じるがん幹細胞の生成機構を解析することにより、がん幹細胞マーカーとこれまでに成果を上げてきた炎症特異的 DNA 損傷マーカー 8-ニトログアニンとを組み合わせることで、感染・炎症による発がんリスク評価およびがん予防に有用な二重バイオマーカー解析法を開発できると考えた。

2. 研究の目的

感染・炎症から発がんに至る過程で幹細胞/前駆細胞に蓄積する DNA 損傷が関与していることを明らかにすることを目的とし、患者の生体試料を用いて幹細胞/前駆細胞における DNA 損傷を解析する。また、がん幹細胞の生成にもなって発現するタンパク質、さらに損傷や修飾を受けたタンパク質をプロテオミクス解析により明らかにする。

炎症による幹細胞/前駆細胞の悪性化を反映する新規タンパク質を検索し、発がんリスクとの相関を明らかにすることにより、新規バイオマーカーを開発する。さらに、既に開発した DNA 損傷マーカーと組み合わせ、炎症関連発がんのリスクをより高精度に評価できる二重バイオマーカー解析法を確立し、がん予防法の開発を目指す。

炎症により幹細胞/前駆細胞が活性化されることにより、炎症部位で生成される変異誘発性 DNA 損傷が、幹細胞のがん化に関与することを明らかにし、炎症関連発がんのヒトでの分子機構を解明するところが独創的である。さらに、がん幹細胞の新規タンパク質マーカーをプロテオミクス解析により探索し、DNA 損傷マーカーである 8-ニトログアニンとの組み合わせ解析を行い、発がんリスクと相関の高い二重バイオマーカー解析法の確立を目指すことが本研究の特色である。

3. 研究の方法

(1) 炎症関連疾患患者の生体試料収集
関連すると思われる疾患患者にインフォームドコンセントを行い、同意の得られた患者から生検組織および手術標本を採取し、パラフィン切片を作製した。血液および尿を採取した。

(2) 抗 8-ニトログアニン抗体の作製
8-ニトログアニシンのリボースを開裂して

生成したアルデヒドとウサギ血清アルブミンとの複合体を作成して、ウサギに皮下注射した。血液を採取し、アフィニティーカラムを用いて高感度かつ特異的な抗 8-ニトログアニン抗体を精製した。

(3) 非感染要因による炎症モデル動物
アスベストは感染要因ではないが、吸入曝露により肺に炎症を起こす。紫外線は照射した皮膚に炎症を起こす。アスベスト曝露マウス、および紫外線照射ヘアレスマウスについて、それぞれ肺組織と皮膚組織を採取し、標本作製した。

(4) 8-ニトログアニンの局在の検討
炎症関連疾患患者および炎症関連モデル動物より得た組織標本と各種市販抗体および自作した 8-ニトログアニン抗体を用いて、二重蛍光免疫組織染色を行った。8-ニトログアニンおよび酸化 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成部位を解析し、炎症像との関係を検討した。8-ニトログアニンの相対的生成量を免疫組織染色の所見から定量化し、各疾患の病期および予後(生存期間)との関連について解析した。腫瘍性疾患に関しては、癌部と非癌部における所見を比較した。

(5) 幹細胞/前駆細胞の解析
幹細胞/前駆細胞、がん幹細胞に特異的なタンパク質の抗体を用いて、免疫組織化学的手法によりがん幹細胞の局在とその部位での 8-ニトログアニンなどの DNA 損傷性を調べた。

4. 研究成果

(1) 住血吸虫感染

ビルハルツ住血吸虫は膀胱癌を起こす原因となることが知られている。ビルハルツ住血吸虫感染による膀胱炎患者と膀胱癌患者の組織標本では、変異誘発性 DNA 損傷塩基の 8-ニトログアニンと 8-oxodG の生成は、正常組織に比べて膀胱癌組織で有意に高いことが明らかとなった。ビルハルツ住血吸虫感染による膀胱癌と非感染者の膀胱癌を比較したところ、感染患者の膀胱癌組織では Oct-4/3 が発現し、非感染患者の膀胱癌組織では CD44v6 が発現していた。Oct-4/3 および CD44v6 は幹細胞/前駆細胞マーカーであり、それぞれの発現は 8-ニトログアニンの局在と一致していた。これは、幹細胞がん化の機構を解明するうえで、非常に興味深い。

(2) バレット食道炎

逆流性食道炎などによる食道がんの前がん病変と考えられているバレット食道炎の腸上皮化生には、8-ニトログアニンと幹細胞マーカー Glypican-3 の染色陽性が確認された。変異誘発性の DNA 損傷塩基と幹細胞マーカーの局在が一致する細胞が、前がん病変およびがん病変で確認できたことは、炎症関連発がんにおいてがん幹細胞説が重要であること

を示しており、非常に興味深い成果である。

(3) アスベスト

アスベスト暴露は、肺癌・中皮腫を起こすことが知られているが、発がん機構の解明は不十分である。アスベストは種類によって発がん性の強さが異なり、本研究では免疫組織染色の結果から、発がん性の強い種類であるほど、暴露マウスの肺組織で8-ニトログアニンの生成・蓄積量が多いことを確認しており、各種幹細胞マーカーを用いた解析を進めているところである。

(4) ナノ素材

近年利用が増えているナノ素材の吸入は、肺に慢性炎症を起こして発がんに関与する恐れがある。ナノ素材の一つ多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、実験動物に中皮腫を引き起こす。ヒト肺上皮由来の培養細胞にMWCNTを曝露して解析した結果、MWCNTはカベオラおよびクラスリンのエンドサイトーシスの機構により細胞内へ取り込まれ、iNOSを発現させ、一酸化窒素(NO)生成によりニトロ化DNA損傷を引き起こして発がんに関与する可能性が示された。

(5) 紫外線

紫外線は皮膚癌のリスク要因となる。光エネルギーによる直接的DNA損傷や光増感物質による間接的な酸化DNA損傷の関与が考えられているが、紫外線による皮膚炎症の関与も考えられる。紫外線誘発皮膚癌のモデルマウスを用いて検討した結果、UVB照射マウスの皮膚組織、特に表皮基底の核で、8-ニトログアニンが観察された。これは、幹細胞がん化の機構を解明するうえで、非常に興味深い。

以上のように、8-ニトログアニンとがん幹細胞マーカーの局在が一致する例が確認された。本研究では、感染のみならず非感染要因による炎症においても、発生する活性酸素・窒素種による変異誘発性のDNA損傷が、幹細胞/前駆細胞で生成され、発がんに関与する可能性が示された。

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 20 件)

1. Thanan R, Ma N, Iijima K, Abe Y, Koike T, Shimosegawa T, Pinlaor S, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Kawanishi S. Proton pump inhibitors suppress iNOS-dependent DNA damage in Barrett's esophagus by increasing Mn-SOD expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(2):280-5. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.152
2. Guo F, Ma N, Horibe Y, Kawanishi S, Murata M, Hiraku Y. Nitritative DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260(2):183-92. 査読有り DOI: 10.1016/j.taap.2012.02.010
3. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitritative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 623019. 査読有り DOI: 10.1155/2012/623019
4. Thanan R, Murata M, Ma N, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S. Nuclear Localization of COX-2 in relation to the Expression of Stemness Markers in Urinary Bladder Cancer. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:165879. 査読あり DOI: 10.1155/2012/165879
5. Ma N, Thanan R, Kobayashi H, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, Hiraku Y, Amro el-K, Oikawa S, Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. Nitritative DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414(2):344-9. 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.073
6. Ohnishi S, Saito H, Suzuki N, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Nitritative and oxidative DNA damage caused by K-ras mutation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(2):236-40. 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.076
7. Murata M, Kawanishi S. Mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic arylamines. *Front Biosci*. 2011;16:1132-43. Review. 査読あり DOI: 10.2741/3739
8. Mizutani H, Hiraku Y, Tada-Oikawa S, Murata M, Ikemura K, Iwamoto T, Kagawa Y, Okuda M, Kawanishi S. Romidepsin (FK228), a potent histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide. *Cancer Sci*. 2010; 101(10): 2214-9. 査読あり DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01645.x
9. Watanabe C, Egami T, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. DNA damage and estrogenic activity induced by the environmental pollutant 2-nitrotoluene and its metabolite. *Environ Health Prev Med*.

- 2010 ;15(5):319-26. 査読あり DOI: 10.1007/s12199-010-0146-1
10. Ma N, Sasoh M, Kawanishi S, Sugiura H, Piao F. Protection effect of taurine on nitrosative stress in the mice brain with chronic exposure to arsenic. *J Biomed Sci.* 2010 Aug 24;17 Suppl 1:S7. 査読あり DOI: 10.1186/1423-0127-17-S1-S7
 11. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos- induced carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 ;1203:15-22. Review. 査読あり DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05602.x
 12. Tada-Oikawa S, Oikawa S, Hirayama J, Hirakawa K, Kawanishi S. DNA damage and apoptosis induced by photosensitization of 5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via singlet oxygen generation. *Photochem Photobiol.* 2009;85(6):1391-9. 査読あり DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00600.x
 13. Oikawa S, Kobayashi H, Tada-Oikawa S, Isono Y, Kawanishi S. Damage to cellular and isolated DNA induced by a metabolite of aspirin. *Mutat Res.* 2009 10;661(1-2):93-100. 査読あり DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.11.016
 14. Ma N, Sasaki T, Sakata-Haga H, Ohta K, Gao M, Kawanishi S, Fukui Y. Protective effect of taurine against nitrosative stress in the stomach of rat with water immersion restraint stress. *Adv Exp Med Biol.* 2009;643:273-83. 査読あり
 15. Hiraku Y, Kawanishi S. Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitritative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis. *Methods Mol Biol.* 2009;512:3-13. 査読あり DOI: 10.1007/978-1-60327-530-9_1
3. 及川伸二, 神経変性疾患における酸化損傷タンパク質の同定. 日本酸化ストレス学会東海支部 設立シンポジウム, 2012年2月18日, 名古屋
 4. Mo Yingxi, Genome-wide profiling of DNA methylation identifies epigenetic targets and aberrant methylation of TFPI2 in nasopharyngeal carcinoma. 日本環境変異原学会第40回大会, 2011年11月21日-11月22日, 東京
 5. Guo Feiye, 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回日本癌学会学術総会, 2011年10月5日, 名古屋市
 6. Mo Yingxi, 上咽頭がんにおけるゲノムワイドなメチル化DNAの解析. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋市
 7. Xiao Xue, Epigenetic inactivation of paracrine-FSTL1 modulates macrophage functions in nasopharyngeal carcinoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋市
 8. S. Kawanishi, N. Ma, M. Onoda, H. Inano, S. Ohnishi, M. Murata. : Role of mutagenic 8-nitroguanine in estrogen-dependent radiation-induced mammary tumorigenesis of rats. 14th International Congress of Radiation Research. Warsaw, Poland. 2011.8.
 9. 大西 志保, 発がん性クメンの光照射による酸化的DNA損傷. 第33回日本光医学・光生物学会, 2011年7月22日, 大阪府吹田市
 10. 馬 寧, 紫外線誘発皮膚癌のモデルマウスにおける8-ニトログアニン生成. 第33回日本光医学・光生物学会, 2011年7月22日, 大阪府吹田市
 11. 及川伸二, 天然色素プルプリンによるDNA損傷機構の解明. がん予防大会2011 京都(第18回日本がん予防学会), 2011年6月20-21日, 京都
 12. S. Kawanishi, S. Ohnishi, H. Saito, N. Suzuki, Y. Hiraku, M. Murata. : K-ras activation and oxidative DNA damage. 2009 Annual Meeting of the Society for Free Radical Research-Europe, Rome, Italy, 2009.8.

[学会発表] (計20件)

1. Mo Yingxi, RRAD with tumor suppressive function is aberrantly methylated in nasopharyngeal carcinoma. 第82回日本衛生学会総会, 2012年3月25-26日, 京都
2. 王淑民, 上咽頭癌におけるTFPI-2プロ
及川伸二, 虚血再灌流後のサル黒質におけるカルボニル化タンパク質の同定. 第82回日本衛生学会総会, 2012年3月25-26日, 京都

[図書] (計5件)

1. N. Ma, M. Murata, S. Ohnishi, R. Thanan, Y. Hiraku, S. Kawanishi. Chapter 10, 8-Nitroguanine, a Potential Biomarker to Evaluate the

- Risk of Inflammation-Related Carcinogenesis. 2012.4, Biomarker (Edited by Tapan Kumar Khan), InTech, p. 201-224
2. S. Kawanishi, S. Ohnishi. Chapter IX, Oxidative DNA Damage and DNA Adducts Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aromatic Amines. 2010.4, DNA Adducts Formation, Detection and Mutagenesis (Editors: Emerson Alvarez, Roberto Cunha), Nova Science Pub Inc., p.169-181
 3. S. Kawanishi, S. Ohnishi. K-ras activation and oxidative DNA damage. 2009.8, Free Radicals, Health and Lifestyle (Editors: Daniela Caporossi, Fabio Pigozzi, Stefania Sabatini), Medimond, p.75-78
 4. 川西正祐、大西志保. 第1章 炎症、C.2 炎症とがん. 2009.6, 炎症・再生医学事典 (松島綱治、西脇徹 編) 朝倉書店、p. 328-331

(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

及川 伸二 (OIKAWA SHINJI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10277006

大西 志保 (OHNISHI SHIHO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
研究者番号：80511914

馬 寧 (MA NING)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授
研究者番号：30263015
(H23のみ)

(3)連携研究者

井上 純子 (INOUE SUMIKO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
研究者番号：20378657

田畑 務 (TABATA TSUTOMU)
三重大学大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：40252358

小林 由直 (KOBAYASHI YOSHINAO)

三重大学大学院・医学系研究科・講師
研究者番号：70378298
(H21のみ)

堀木 紀行 (HORIKI NORIYUKI)
三重大学医学部附属病院・講師
研究者番号なし
(H21のみ)

飯島 克則 (IIJIMA KATSUNORI)
東北大学病院・消化器内科・助教
研究者番号：60375003
(H22～H23)