

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22240093

 研究課題名（和文）環境発がんリスク評価体系—中皮腫惹起能と早期予測指標に関する研究—  
 研究課題名（英文）Risk evaluation of environmental carcinogenesis

研究代表者

樋野 興夫（HINO OKIO）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：90127910

研究成果の概要（和文）：

我々の開発した中皮腫の血液測定キットを用い、東京土建国民健康保険組合の協力を得て早期のアスベスト・中皮腫を効率的・高精度に発見する総合的中皮腫早期診断システムを構築した。一方、ナノ材料は、最先端の素材として最も重要なものの1つである。それらの安全性、ことに発がん性の確認は、必須の事柄であることから、実験的に発がん性評価を視野に入れて検討を行った。ナノホーン、カーボンナノチューブなどサイズの異なるナノ粒子とナノファイバーを使用した。本研究は、中皮腫惹起能のある因子による発がんの初期過程の病理学的観察と経時的な血液バイオマーカー変動との相関を見る極めてユニークなものであり、バイオマーカー機能を持つ新規遺伝子医薬・抗体による新規治療法開発にも資する。

研究成果の概要（英文）：

We reported N-ERC/mesothelin might be a useful blood tumor marker for mesothelioma. In order to investigate whether this tumor marker is useful for an early diagnosis in a mass examination, we started a large-scale pilot research screening in Japan for construction workers with the risk of asbestos exposure. In conclusion, it is indicated that the blood tumor marker is useful for an early diagnosis in a mass examination and may lead to the prolongation of their survival. We have demonstrated that plasma N-ERC levels of rats administered multi-wall carbon nanotube, man-made mineral fibers or chrysotile were continuously higher even at 10 weeks after intraperitoneal (i.p.) injection than the other non-carcinogenic materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2011年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2012年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
年度			
年度			
総計	33,500,000	10,050,000	43,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学 がん疫学・予防

キーワード：がん研究と社会の接点、アスベスト、ナノマテリアル、環境発がん

## 1. 研究開始当初の背景

2005年にわが国で初めて順天堂大学に「アスベスト・中皮腫外来」を開設し、アスベストに暴露経験のある患者の検診を進める一方、東京土建国民健康保険組合と連携して、建築作業員等の研究型検診を推進した（毎日新聞2007年1月12日付け、読売新聞2007年2月18日付け）。中皮腫患者のデータなどを参考に、中皮腫の発症が疑われるErc/mesothelinタンパクの血中濃度（カットオフ値）を定め、研究型検診受診者のスクリーニングを行ったところ約30,000人の時点で、既に約80名が高リスクと判定され、うち約30名弱が2次スクリーニングを受診し、1名がPET診断と病理診断により中皮腫と確定された。これは自覚症状が全く無い状態で、偶然ではなく血液診断という科学的データに基づき中皮腫患者が特定された世界初のケースであり、大いに注目された（読売新聞2008年5月2日付け、朝日新聞2008年7月19日付け、毎日新聞2008年7月19日付け）。

天然鉱物であるアスベストが繊維状粒子として大気飛散することによって中皮腫や肺がんのリスクとなるのが大きな環境問題となっており、まだ、5年を経過していない。アスベストに対して国際がん研究機関（IARC）がヒトに対する発がんの根拠あり（グループ1）とする物質の1つとして評価してからは、約20年を経過している。その間に、各種のアスベスト代替繊維として人工鉱物繊維（MMMF）が開発され、IARCはそれらに対して2度（1988、2002）の評価を行っているが多種多様なMMMFを網羅されていない状況にある。また、最近、ナノマテリアルとして期待されていた多層カーボンナノチューブを投与した動物実験による中皮腫発生の報告（Takagiら2008、Sakamotoら2009）が注目されている。

繊維状粒子の生体影響の評価は、環境問題として重要であるにもかかわらず、そのメカニズムが明らかでないこと、天然と人工の物質が存在すること、それに伴い多種多様な物性があることなどにより個々のリスク評価に追われる状況にある。StantonとPottの仮説は、繊維状粒子の発がん性を形状（径と長さ）から説明可能な唯一の仮説であるが、人工繊維状粒子が増えるにしたがい、この仮説で説明できない例（Adachiら2001）も明らかになっている。アスベストをはじめとする天然鉱物

繊維とナノファイバーを含む人工繊維状粒子に共通する発がん性という視点からの機構解明とリスク評価が必要な状況にあると考えている。

また、繊維状粒子への曝露と密接な関係にある中皮腫は、曝露から20～40年という長期間を経て発症するが診断は難しく、治療成績は世界的に見ても5年生存率5%を超えないきわめて予後の悪い疾患である。それにもかかわらず、日本やアジア地域では今後の発症数増加が予測されている。申請者らは、胸膜や腹膜の中皮に存在するERC（mesothelin/MFP）遺伝子産物がヒト悪性中皮腫の腫瘍マーカーになることや血液診断用ELISA（酵素免疫測定）キットを開発しCT等による画像所見で中皮腫が顕在化する以前に発見することを可能にしてきたが、さらに早期に予測できる指標を見出すことは管理や早期治療といった対策面で極めて重要である。

これらの背景から、繊維状粒子による健康被害の予防・対策に資するため、本課題では繊維状粒子の中皮腫誘発リスクと早期予測指標に関する検討も行う。

## 2. 研究の目的

国民の健康障害に関する重要課題解決型研究として、「アスベスト・中皮腫」の克服に向けた総合戦略は「目下の急務」である。アスベストにより誘発される中皮腫は、一旦発症したら治療が難しいため早期発見・早期治療が重要である。本研究の目的は、腫瘍マーカーの開発と臨床的有用性の探索のみならず、発症前・早期診断・早期治療、またリスクファクターの同定など中皮腫の診療体系全体の発展に寄与しようとするものである。また、ラット発がんモデルを用いて、中皮腫の発がん過程の初期病変の実体を明らかにして、ヒト中皮腫発がんの進展・予防戦略に資する。さらにナノマテリアルについても、同様の手法を用いて発がん実験を進め、申請者らが開発したラットELISA測定系で、アスベスト代替品・ナノマテリアルの形状の違いによる発がん性の短期スクリーニングの有効性も検証する。

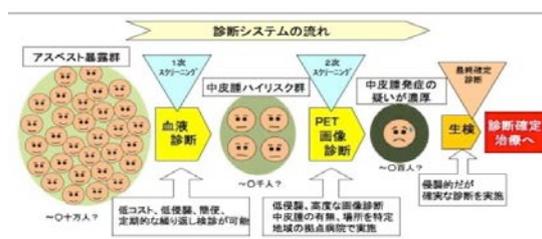
## 3. 研究の方法

申請者らの開発した中皮腫の血液測定キットを用い、東京土建国民健康保険組合の協力を得て早期の中皮腫患者を効率的・高精度に発見する総合的中皮腫早期診断システムを構築する(図1, 2)。ナノ材料は、最先端の素材として最も重要なものの1つである。それらの安全性ことに発がん性の確認は、必須の事柄であることから、実験的に発がん性評価を視野に入れて検討を行う。ナノホーン、カーボンナノチューブなどサイズの異なるナノ粒子とナノファイバーを使用する。評価は、(1)血液検査(申請者らが独自に開発したラットERC ELISA測定系を用いる)(2)経時的に採取した細胞(臓側胸膜、胸壁胸膜、腹膜)のDNAチップによるスクリーニング(3)病理学的な腫瘍検索を行う。

図1



図2



#### 4. 研究成果

環境発がんリスク評価体系-中皮腫惹起能に関する研究：雌性F344ラットへの酸化チタン3種(P：球形、F100：短繊維、F400：長繊維)、クリソタイルアスベスト(Chr)、人工鉱物繊維のチタン酸カリウム繊維(KT)、シリコンカーバイト繊維(SiC)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に、超音波による開裂処理を施したクリソタイル2種(短時間および長時間処理)を加えて、腹腔内投与後の経時

的なN-ERC変化の観察を行った。特殊な超音波処理によってアスベスト繊維の長さを変えず、繊維をナノサイズに開裂させることに成功した。中皮腫惹起能に対する繊維状粉じんの繊維径がナノサイズとなった場合の影響を、ラット腹腔内投与による腫瘍発生も併せて観察を進めた。投与後1週、2週、4週、10週、20週に、採血(N-ERC ELISA法で測定)、腹腔内洗浄液の採取、組織の病理組織学的観察した。繊維状粒子では血清N-ERCの持続的な発現がみられた。組織においても陽性的中皮細胞の増殖を認めた(図3)。

図3



環境発がんリスク評価体系-早期予測指標に関する研究：中皮腫の長期生存・治療において、発症前診断・早期病変発見は急務である。簡便な高感度の血液検査による診断法の開発と新規治療法の開発を進めた。中皮腫早期診断の可能性を検討すべく、東京土建国民健康保険組合と連携して、職業的アスベスト暴露経験者と考えられる建築作業員等の大規模研究型検診を、延べ17万検体について推進し、高値を示すハイリスク群をフォローアップした。その中で、現時点で3名が中皮腫を発症しており、これは自覚症状が無い段階でN-ERC/Mesothelin検査が高値になり、精査していくなかで中皮腫と確定診断された事例である(図4, 5)。

ERC産物(70 kDa)は蛋白分解酵素で切断され、40 kDaのC末(C-ERC)と30 kDaのN末(N-ERC)に別れる。C-ERCは膜表面に残り、正常組織では中皮細胞に特異的に染色される。腫瘍では、上皮型中皮腫で高発現しており、細胞接着に関与する。一方、N-ERCは細胞外に分泌され、中皮腫患者の血清中に高濃度に検出されるものの、その機能については不明であった。我々は、分泌型N-ERCに細胞死抑制効果があることを見出した。N末を強制発現させると、細胞内のERK1/2のリン酸化は亢進した。また、細胞死を抑制し、細胞増殖曲線を上昇させた。血液中で分泌され

ている N 末は、腫瘍細胞に対して増殖因子として働いている可能性が示唆された。また、N-ERC に結合する蛋白の存在を確認した。

申請者らは C-ERC 抗体を使った治療研究を進めており、動物実験レベルでは好成績を収めている。ヒト化抗体の完成を目指す。

本研究の成果は、中皮腫惹起能のある因子による発がんの初期過程の病理学的観察と経時的な血液バイオマーカー変動との相関を見る極めてユニークなものであり、今後のバイオマーカー機能を持つ新規遺伝子医薬・抗体による新規治療法開発にも資する。

図 4

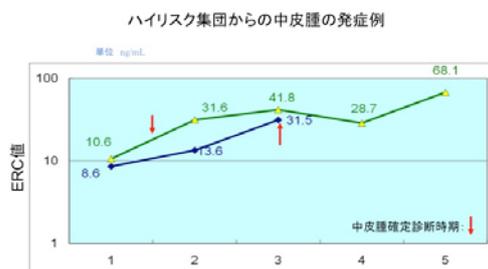
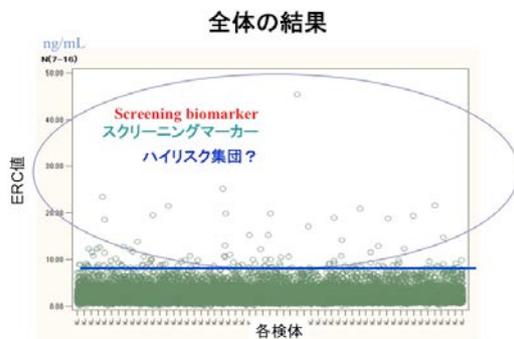


図 5



##### 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. Sakamoto Y., Nakae D., Hagiwara Y., Satoh K., Ohashi N., Fukamachi K., Tsuda H., Hirose A., Nishimura T., Hino O. and Ogata A.: Serum level of expressed in renal carcinoma

(ERC)/mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). The Journal of Toxicological Sciences 35: 265-270, 2010

2. Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody *in vivo*. Cancer Sci. 101: 969-974, 2010
3. Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.: Development of positron emission tomography imaging by <sup>64</sup>Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. Nuclear Medicine Communications, 31: 380-388, 2010.
4. Sudo H., Tuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.: Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. Genomics, 95: 210-216, 2010.
5. Tan K., Kajino K., Momose S., Masaoka A., Sasahara K., Shiomi K., Izumi H., Abe M., Ohtsuji N., Wang T., Hino O. and Fujii H.: Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant mesothelioma, but its expression is not associated with methylation status of the promoter.

- Human Pathol. 41: 1330–1338, 2010
6. Wang T., Kajino K., Abe M., Tan K., Maruo M., Sun G., Hagiwara Y., Maeda M. and Hino O.: Suppression of cell death by the secretory form of N-terminal ERC/mesothelin. *Int. J. Molecular Med.* 26: 185–191, 2010
  7. Obulhasim G., Fujii H., Matsumoto T., Yasen M., Abe M., Matsuoka S., Ohtsuji N. and Hino O.: Mesothelin gene expression and promoter methylation/hypomethylation in gynecological tumors. *Eur. J. Gynaec. Oncol.* 31: 63–71, 2010
  8. Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M., Jishage K., Noda T. and Hino O.: Deficiency of the *Erc/mesothelin* gene ameliorates renal carcinogenesis in *Tsc2* knockout mice. *Cancer Science* 102: 720–727, 2011.
  9. Imashimizu K., Shiomi K., Maeda M., Aoki N., Igarashi K., Suzuki F., Koizumi M., Suzuki K. and Hino O.: Feasibility of large-scale screening using N-ERC/mesothelin levels in the blood for the early diagnosis of malignant mesothelioma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2: 409–411, 2011
  10. Shiomi K., Shiomi S., Ishinaga Y., Sakuraba M., Hagiwara Y., Miyashita K., Maeda M., Suzuki K., Takahashi K. and Hino O.: Impact of renal failure on the tumor markers of mesothelioma, N-ERC/mesothelin and Osteopontin. *Anticancer Research*, 31: 1427–1430, 2011
  11. Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Ishizu Y., Okamura-Oho Y., Hino O., Abe M., Kishimoto T., Sekihara H., Nakamura Y., Suzuki H., Forrest A.R.R. and Hayashizaki Y.: LRR4 and UPK3B are markers of primary mesothelial cells. *PLoS One*, 6: e25391–25399, 2011.
  12. Saeki H., Hashizume A., Izumi H., Suzuki F., Ishi K., Nojima M., Maeda M. and Hino O.: The utility of serum N-ERC/mesothelin as biomarker of ovarian carcinoma. *Oncology Letters*, 4: 637–641, 2012.
  13. Mori T., Tajima K., Hirama M., Sato T., Kido K., Iwakami S., Sasaki S., Iwase A., Shiomi K., Maeda M., Hino O. and Takahashi K.: The N-ERC index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *J. Thoracic Disease*, in press
  14. Akatsuka S., Yamashita Y., Ohara H., Liu Y-T., Izumiya M., Abe K., Ochiai M., Jiang L., Nagai H., Okazaki Y., Murakami H., Sekido Y., Arai E., Kanai Y., Hino O., Takahashi T., Nakagama H. and Toyokuni S.: Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PloSONE*, in press.
  15. Kawamata F., Homma S., Kamachi H., Einama T., Kato Y., Tsuda M., Tanaka S., Maeda M., Kajino K., Hino O., Takahashi N., Kamiyama T., Nishihara H., Taketomi A. and Todo S.:

C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. J. Gastroenterology. in press.

[学会発表] (計 2件)

- 1) Mizoi M., Nakatani E., Adachi S., Hino O.: Correlation between plasma N-fragment of expressed in renal carcinoma level and carcinogenicity of fibrous materials. 第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日～21日、札幌
- 2) Adachi S., Mizoi M., Omura S., Kobayashi T. and Hino O.: Histological lesions and plasma N-ERC/mesothelin changes in rats after an intraperitoneal administration of nanomaterials. IUMRS-International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012), The Materials Research Society of Japan (MRS-J), 2012. Sep. 23-28, 2012, Yokohama

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樋野 興夫 (HINO OKIO)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：90127910

### (2) 研究分担者

安達 修一 (ADACHI SHUICHI)  
相模女子大学・栄養科学部・教授  
研究者番号：90129148