

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390094

研究課題名(和文) 中皮細胞の発がん機構解析による予防基盤の形成

研究課題名(英文) Establishing preventive strategy for mesothelioma by elucidating its carcinogenic mechanism

研究代表者

豊國 伸哉 (TOYOKUNI, SHINYA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90252460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：中皮腫の発生機構をラット腹腔内にアスベストを投与するモデルを使用して解析し、ヒト中皮腫に酷似した遺伝子変化をきたすこと、局所の鉄過剰が主要な病態であることを明らかにした。鉄キレート剤デフェラシロクスの予防投与により、予後の比較的よい上皮型中皮腫の割合が有意に増加することを明らかにした。さらに、肉腫型中皮腫を規定し、中皮腫細胞の増殖に重要な遺伝子として、結合組織成長因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the molecular carcinogenic mechanisms of mesothelioma by the use of rat model of intraperitoneal asbestos injection. This model revealed a very high incidence of mesothelioma with similar genetic alterations to human counterparts. We recognized that local iron overload is an important pathogenic factor, and showed a significant increase in epithelioid subtype that show favorable prognosis after preventive administration of an iron chelator, deferasirox. Furthermore, we identified connective tissue growth factor as a major responsible gene for sarcomatoid subtype and also for proliferation of mesothelioma cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：中皮腫 アスベスト 鉄 マイクロアレイ解析 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アスベストは繊維状鉱物であり耐火性・耐摩耗性・耐酸性に優れた素材であったため、前世紀に世界中で多量に使用された。しかし、アスベスト曝露と中皮腫の関係が明らかとなったため 1987 年には IARC (WHO) から Group 1 の発がん物質との指定を受けた。日本においては、クボタショック後の 2006 年に全面禁止となったが、中皮腫は曝露からの潜伏期間が 30-40 年と極めて長いのが特徴であり、日本での中皮腫発症のピークは 2025 年、今後 40 年間に 10 万人以上の新たな発症が予測されている。

(2) アスベスト繊維による中皮腫発症の分子機構はほとんどわかっておらず、優れた動物モデルの報告もない。

(3) 中皮腫のよい診断マーカー、分子標的治療のための標的分子や予防手段はまだ報告がない。

## 2. 研究の目的

(1) 予防実験に資する、アスベスト繊維投与による動物中皮腫発がんモデルを作成する。

(2) 上記動物モデルの解析から、アスベスト繊維による中皮腫発症の病態として何が重要かを決定する。

(3) 上記動物モデルの解析の詳細な解析より、診断・治療・予防に資する分子を決定する。

(4) 上記結果に基づき予防実験を行い、評価を行う。

(5) 商業的にはあまり使用されなかったマイナーなアスベスト繊維 (トレモライト・アンソフィライト) についても、中皮腫発がん性の評価を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 商業的に使用されたアスベスト繊維 (白石綿、青石綿、茶石綿) の標準品をラット腹腔内に 10 mg 投与し、中皮腫発がん性

を相互に比較すると同時に、病理学的に解析した。

(2) 得られた腫瘍を分類し、その CGH ならびに発現マイクロアレイ解析により、ゲノムや遺伝子発現の変化を検討した。

(3) 上記より「過剰鉄」病態が重要であると判明したため、瀉血と鉄キレート剤投与によるアスベスト誘発中皮腫の予防実験を施行した。

(4) 肉腫型・上皮型中皮腫の相違を規定している遺伝子を抽出し、その遺伝子の役割をノックダウンや遺伝子導入実験で検討した。同遺伝子産物の血清濃度と予後の関係を検討した。

(5) トレモライトとアンソフィライトのラット腹腔内投与による発がん実験を施行し、評価した。

## 4. 研究成果

(1) ラットの腹腔内へ標準アスベスト繊維 10 mg を投与するとほぼ全動物に悪性中皮腫を発生した。50%の動物が中皮腫になるのに要する日数は白石綿 (クリソタイル) 552 日、青石綿 (クロシドライト) 618 日、茶石綿 (アモサイト) 647 日であり、予想に反してそれ自身には鉄を含まない白石綿が最も早かった。これは中皮細胞への発がん性は白石綿も十分高いことを意味する。肺からのクリアランスは青石綿 / 茶石綿より高いと考えられるものの注意を喚起したい。また、フェントン反応を促進するニトリロ三酢酸 (NTA; Chry, chrysotile; Cro, crocidolite;

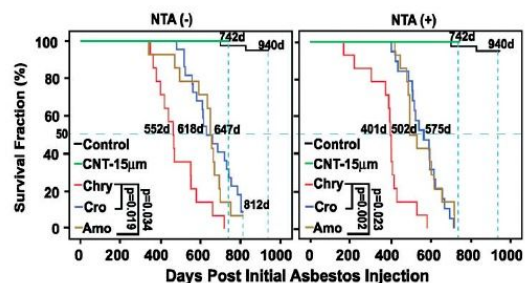


図1 ラット腹腔内へアスベスト 10 mg 投与による中皮腫の発生と NTA による促進

Amo, amosite)の反復投与をアスベスト投与後に行うと、3種すべての石綿で中皮腫発生が有意に早くなった。これは「鉄過剰」が本発がん重要な病態であることを意味する。腹腔内臓器鉄や血清フェリチンも対応して高かった。また、ヒトと異なり、肉腫型発生の割合がほぼ半分と高かった。ゲノムには欠損・増幅が多く、共通変化として

*p16<sup>INK4A</sup>/p15<sup>INFB</sup>* のホモ欠損を 92.6%に認めた。この結果はこれまでの鉄ニトリロ三酢酸によるラット腎がんのデータと比較すると鉄発がんであることを支持し、ヒト中皮腫のゲノム変化にも合致するものであった。すなわち、wild-type ラットを使用した本モデルが、アスベスト繊維に起因する中皮腫の優れたモデルであることが判明した。

(2) マイナーなアスベストであるトレモライトとアンソフィライトの発がん実験も上記と同様に施行した。トレモライトには高い中皮腫発がん性が確認されたが、アンソフィライトでは中皮腫発がん性が確認されなかった。

瀉血ならびに経口投与が可能な鉄キレート剤デフェラシロクスを使用して、上記モデルでアスベスト誘発中皮腫の発がん予防実験を行った。すると、今回の実験条件では中皮腫発生率や発生時期の変化は認められなかったが、デフェラシロクスの投与で予後のよりよい上皮型が有意に増加した。瀉血には効果が認められなかったが、今回の結果は過剰瀉血による可能性があるため、さらに検討

Histopathology of Cro-injected rats		
	NT	Deferasirox
Epithelioid	4	6
Biphasic	12	3
Sarcomatoid	35	6
Total	51	15
P value		0.0086

図2 デフェラシロクスによる組織型の変化としての中皮腫予防

の必要性があると考え (NT, no-treated)。

(3) 上皮型(EM)と肉腫型(SM)のラット中皮腫を使用して発現マイクロアレイ解析を行い、2つの組織型を決定している遺伝子を検討した。すると、Connective Tissue Growth Factor (CTGF; CCN2)が主要な責任遺伝子として選出された。CTGFをノックダウンすると、中皮腫細胞の増殖やコロニー形成が抑制されることから、CTGFは悪性形質の維持に重要であることが示した。また、CTGFは分泌されており、カテニンならびにCTGF受容体のLRP6と悪循環のオートクラインループを形成していることがわかり、これまでのTGF- $\beta$ やHippoシグナル伝達系に加えて、Wnt-カテニン系もCTGFの高発現に重要であることが判明した。血清において中皮腫、特に肉腫型で高濃度であり、ラットの前向き試験では、血清CTGF濃度が高いほど中皮腫の発生が早かった。

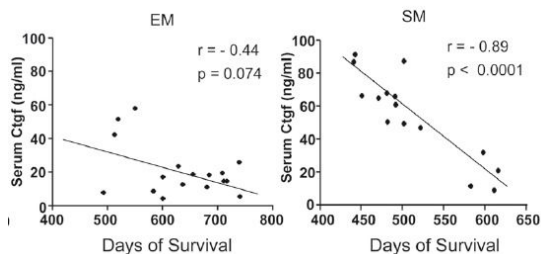
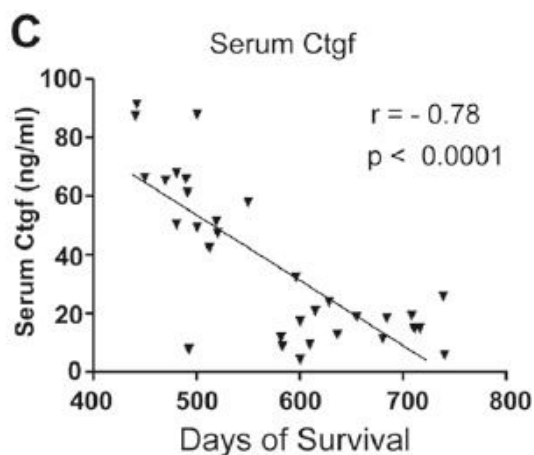
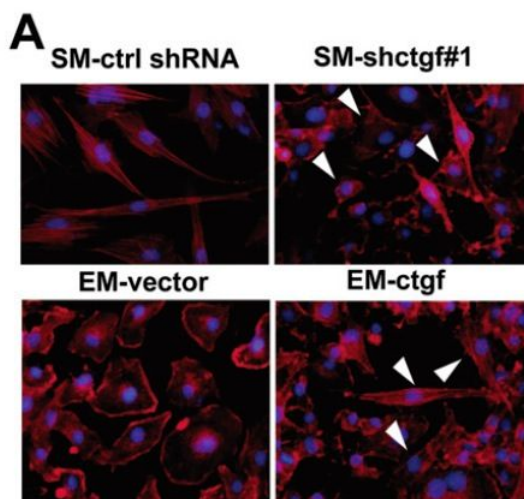


図3 血清CTGF値とその後のアスベスト投与ラットの予後(縦軸はアスベスト繊維投与後420日のラット血清CTGF値である;EM 上皮型、SM 肉腫型)

次に、肉腫型中皮腫において CTGF をノックダウンすると、形態が紡錘形から多角形になることがわかり、逆に上皮型中皮腫に CTGF をトランスフェクションすると多角形の形態が紡錘形になることが判明した。



**図 4** CTGF の遺伝子操作による中皮腫細胞の形態の変化（矢頭が変化した形態を示す）

総じて、CTGF は中皮腫、特に肉腫型のよい血清マーカーとなり、化学療法のための標的分子になる可能性が示唆された。

#### 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 13 件)

- (1) Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T and Toyokuni S. Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis* 35: 164-172, 2014. 査読有 DOI:10.1093/carcin/bgt267.
- (2) Toyokuni S. Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis. *Redox Rep* 19: 1-7, 2014. 査読有 DOI:10.1179/1351000213Y.0000000075.
- (3) Mukaide T, Hatori Y, Misawa N, Funahashi S,

Jiang L, Hirayama T, Nagasawa H and Toyokuni S. Histological detection of catalytic ferrous iron with the selective turn-on fluorescent probe RhoNox-1 in a Fenton reaction-based rat renal carcinogenesis model. *Free Radic Res* 48: 990-995, 2014. 査読有 DOI:10.3109/10715762.2014.898844.

(4) Jiang L, Yamashita Y, Chew SH, Akatsuka S, Ukai S, Wang S, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T and Toyokuni S. Connective tissue growth factor and  $\beta$ -catenin constitute an autocrine loop for activation in rat sarcomatoid mesothelioma. *J Pathol* 233: 402-414, 2014. 査読有 DOI:10.1002/path.4377.

(5) Nagai H, Chew SH, Okazaki Y, Funahashi S, Namba T, Kato T, Enomoto A, Jiang L, Akatsuka S and Toyokuni S. Metamorphosis of mesothelial cells with active horizontal motility in tissue culture. *Sci Rep* 3: 1144, 2013. 査読有 DOI:10.1038/srep01144.

(6) Toyokuni S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv Drug Deliver Rev* 65: 2098-2110, 2013. 査読有 DOI:10.1016/j.addr.2013.05.011.

(7) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Miyata Y, Shinohara N and Toyokuni S. Intraperitoneal administration of tangled multiwalled carbon nanotubes of 15 nm in diameter does not induce mesothelial carcinogenesis in rats. *Pathol Int* 63: 457-462, 2013. 査読有 DOI:10.1111/pin.12093.

(8) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yasui H and Toyokuni S. Deferasirox induces mesenchymal-epithelial transition in crocidolite-induced mesothelial carcinogenesis in rats. *Cance Prev Res* 6: 1222-30, 2013. 査読有 DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0244.

(9) Nagai H and Toyokuni S. Differences and similarities between carbon nanotubes and asbestos fibers during mesothelial carcinogenesis.

Cancer Sci 103: 1378-1390, 2012.査読有

DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02326.x.

(10) Jiang L, Akatsuka S, Nagai H, Chew SH, Ohara H, Okazaki Y, Yamashita Y, Yoshikawa Y, Yasui H, Ikuta K, Sasaki K, Kohgo Y, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Takahashi T and Toyokuni S. Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. J Pathol 228: 366-377, 2012.査読有  
DOI:10.1002/path.4075.

(11) Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, 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. PLoS ONE 7(8), e43403, 2012.査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0043403.

他、2報

〔学会発表〕(計26件)

(1) 豊國伸哉 発がん要因としての酸化ストレス シンポジウム1:腫瘍病理学の真髄 第103回日本病理学会総会(平成26年4月24日~26日、広島国際会議場、広島県広島市)

(2) Toyokuni S. Cancer as a ferrotoxic disease. Symposium 1: Redox-active ion in disease pathology and treatment. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (March 23-26, 2014; Kyoto International Conference Center, Kyoto, Kyoto; invited speaker).

(3) Toyokuni S. Critical factors in multi-walled carbon nanotubes in mesothelial carcinogenesis. The 46<sup>th</sup> Fullerenes-Nanotubes-Graphene General Symposium. (The University of Tokyo, Ito International Research Center, Bunkyo-ku, Tokyo;

March 3-5, 2014; invited special lecture)

(4) Toyokuni S. Invited lecture 2: Role of iron in carcinogenesis. SFRR India Annual meeting (January 27-30, 2014; Lonavala, India; invited speaker).

(5) Toyokuni S. Plenary talk 2. Role of iron in carcinogenesis. 6th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia (October 16-19, 2013; Chang Gung University, Tao-Yuan, Taiwan; invited speaker)

(6) Nagai H, Okazaki Y, Ishihara T, Chew SH, Misawa N, Yasui H and Toyokuni S. Deferasirox promotes mesenchymal-epithelial transition in crocidolite-induced mesothelial carcinogenesis in rats. 6th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan (Sep 12-14, 2013; Mercure Sydney, Sydney, Australia; S Toyokuni, invited speaker)

(7) 豊國伸哉 シンポジウム:がん研究とモデル動物(モデレーター、座長) モデル動物から明らかになった過剰鉄と発がんの親和性 第72回日本癌学会学術総会(平成25年10月3日~5日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

(8) 豊國伸哉 シンポジウム1:環境物質による発がんリスクとその予防 「アスベスト発がん機構の解明から早期発見・予防への展開」第20回日本がん予防学会(平成25年7月5日~6日、日本薬学会長井記念館、東京都渋谷区)

(9) 豊國伸哉 多層カーボンナノチューブの発がん性を決定する物性因子の発見 シンポジウム:「アイデア」 第36回日本がん疫学・分子疫学研究会(平成25年6月20日~21日、岐阜大学サテライトキャンパス、岐阜県岐阜市;招待講演者)

(10) 豊國伸哉 ナノ材料(CNT)の物性と発がん性 シンポジウム4:ナノマテリアルの評価開発手法における今後の課題 第

40回日本毒性学会学術年会（平成25年6月17日～19日、幕張メッセ 国際会議場、千葉県千葉市、招待講演者）

(11) 豊國伸哉、蔣麗、岡崎泰昌、山下依子、赤塚慎也 酸化ストレスによるゲノム変化と発がん シンポジウム2：細胞ストレス応答の破綻と病態 第102回日本病理学会総会（平成25年6月6日～8日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館、北海道札幌市）

(12) Toyokuni S, Jiang L, Okazaki Y and Akatsuka S. Cancer as a ferrototoxic disease: what we have learned from animal studies towards its prevention. IBIS (April 14-18, 2013; University College London, London, UK).

(13) Toyokuni S. Cancer as a ferrototoxic disease. Free Radical and Metal Biology 2012: Combined meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and the Australian Biometals Group (November 28-December 1, 2012; Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia; invited speaker).

(14) 豊國伸哉 発がん過程における鉄の役割 第71回日本癌学会学術総会（平成24年9月19日～21日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館、北海道札幌市）

(15) 豊國伸哉、蔣麗、岡崎泰昌、赤塚慎也、山下依子 シンポジウム1：鉄代謝の基礎と臨床 過剰鉄と発がん機構の親和性 第36回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（平成24年9月1日～9月2日、京王プラザホテル札幌、北海道札幌市、招待講演者）

(16) 豊國伸哉 アスベスト繊維による発がん機構の解明 第3回「次世代の環境発がんを考える会」公開シンポジウム：中皮腫の早期診断と新規治療法の開発（平成24年8月1日、順天堂大学、東京都文京区、招待講演者）

(17) 豊國伸哉 鉄代謝と発がん（基礎）教育セミナー「微量元素の基礎および臨床最新の展開」1．鉄 第23回日本微量元素学会（平成24年7月5日～6日、砂防会館、

東京都千代田区、招待講演者）

(18) 豊國伸哉 シンポジウム3：金属と酸化ストレスの関係を探る：基礎から臨床研究へ 過剰鉄と活性酸素を介した発がん機構の解明 第65回日本酸化ストレス学会学術集会（平成24年6月7日～8日、あわぎんホール徳島県郷土文化会館、徳島県徳島市、招待講演者）

(19) 豊國伸哉 シンポジウム4：ナノマテリアルと労働衛生環境 呼吸器病理学の基礎とナノマテリアル安全性研究 第85回日本産業衛生学会（平成24年5月31日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、招待講演者）

(20) Toyokuni S. Cancer as a ferrototoxic disease. The 16<sup>th</sup> Korea-Japan and the 2<sup>nd</sup> Korea-Taiwan-Japan Joint Conference for Gynecological Pathology (May 26, 2012; Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto; invited speaker).

(21) 豊國伸哉 ワークショップ：がん研究における疾患モデル動物とその有用性 アスベスト発がんモデルを用いた発症機構の解明と予防の応用 第101回日本病理学会総会（平成24年4月26日～28日、京王プラザホテル、東京都新宿区）

他、5件

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6272/6367/seitaihannoubyourigaku\\_bunshibyourishindangaku.html](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6272/6367/seitaihannoubyourigaku_bunshibyourishindangaku.html)

6．研究組織

(1) 研究代表者  
豊國伸哉 (TOYOKUNI SHINYA)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90252460

(2) 研究分担者  
赤塚慎也 (AKATSUKA SHINYA)  
名古屋大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：40437223

岡崎泰昌 (OKAZAKI YASUMASA)  
名古屋大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：30403489

(3) 連携研究者 なし