

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460813

研究課題名(和文) 黄砂曝露マウスの肺における酸化ニトロ化DNA損傷に基づく発がん性評価と予防

研究課題名(英文) Cancer risk assessment based on oxidative and nitritive DNA damage in murine lung exposed to Asian sand dust

研究代表者

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

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)：大気中浮遊微粒子はヒトに発がん性があり、粘膜附着や肺への進入により炎症を起こす。本研究では、黄砂を曝露したマウスの肺に炎症が認められた。また、酸化DNA損傷マーカーの8-oxodGの増加や、ニトロ化DNA損傷マーカーの8-ニトログアニンの増加が示された。プロテオーム解析では、黄砂曝露により発現量の増減がみられるタンパク質が見つかった。抗酸化および抗腫瘍に関わるタンパク質のひとつが増加傾向、癌抑制に関わる可能性とヒト肺腫瘍での減少が報告されているタンパク質のひとつが減少傾向にあることが分かった。以上、黄砂曝露によって炎症と酸化ニトロ化DNA損傷が起こる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Particulate matter in air pollution is estimated to be carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer. In this study, we found that intranasal exposure to Asian sand dust caused inflammation in murine lung. We demonstrated that 8-oxodG, oxidative DNA damage, and 8-nitroguanine, nitritive DNA damage, were increased in lung tissues of mice exposed to Asian sand dust, by histochemical analysis. The proteomic analysis revealed several tens of up-regulated or down-regulated proteins by Asian sand dust. One of up-regulated proteins was identified to be the protein that was reported to have relevance to anti-oxidation and anti-tumor. One of down-regulated proteins was identified to be the protein that was reported to have the possibility of anti-tumor and decrease in human lung tumor. These suggest that Asian sand dust induces oxidative and nitritive DNA damage in the lung via inflammation.

研究分野：衛生学

キーワード：環境保健 がん予防 炎症 DNA損傷 黄砂

1. 研究開始当初の背景

中国大陸内陸部の砂漠地帯から飛来する黄砂は、地球規模で進んでいる砂漠広域化や気象変化にともない、飛来の頻度や地域が増加している。日本には主として春に黄砂が飛来するが、燃焼由来の浮遊粒子状物質も飛来する。中国大陸における急速な経済発展にともなう大気汚染物質の増加や越境汚染が深刻な問題となっており、今後さらに健康被害が拡大する可能性が高い。国際がん研究機関 IARC は、大気汚染ならびに浮遊粒子状物質を「ヒトに発がん性あり（グループ 1）」に分類されている (*Lancet Oncol.*, 2013)。世界中では 2010 年に約 22 万 3 千人が大気汚染による肺がんで死亡しており (*IARC Scientific Publication No.161*, 2013)、予防対策が急務である。

浮遊粒子状物質は、黄砂などの土壌成分と石炭やディーゼルなどの燃焼由来の微粒子を含む。粒径 2.5 μm 以下の粒子状物質 (PM 2.5) には燃焼由来成分が多く、粒径 2.5-10 μm には土壌成分が多い。日本に飛来する黄砂は粒径が数 μm で肺に進入することから (Bailey *et al. Ann. Occup. Hyg.*, 1982)、燃焼由来と土壌由来の両方の成分が肺に障害を及ぼす可能性がある。

黄砂の主成分の二酸化ケイ素は「ヒトに発がん性あり」(IARC グループ 1) に分類され、黄砂自体も発がん性が強く疑われるが評価はされていない。飛来黄砂は、二酸化ケイ素のほか各種の微量金属を含み、土壌中の微生物由来成分や飛来経路の燃焼由来大気汚染物質などを吸着しており、多くの混合物である。微量金属は酸化ストレスの要因となる可能性があり、微生物由来成分はアレルギー性炎症の要因となる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、炎症条件下では一酸化窒素 (NO) などの活性窒素が産生され、変異誘発性の酸化 DNA 損傷塩基の 8-oxodG (別名 8-OHdG) やニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンが生成することを報告してきた。8-ニトログアニンは、慢性炎症を介したがんでは、がん好発部位に発がん前に生成する (Kawanishi *et al. Biol. Chem.* 2006)。さらに 8-ニトログアニンは、変異型 KRAS による NO 合成酵素 (iNOS) の異常活性化を介してマウス肺腫瘍部位に生成すること (Ohnishi *et al. BBRC.* 2011)、炭素系ナノ素材に曝露したヒト肺由来培養細胞に生成すること (Guo *et al. Toxicol Appl Pharmacol.* 2012) を報告してきた。

本研究では、黄砂など大気汚染物質による肺の障害作用、炎症、DNA 損傷を解析して、発がんリスク評価と予防対策に繋がる基礎

的知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 黄砂土壌採集

中華人民共和国の黄砂発生地近くにおいて、黄砂塵の元になると思われる土壌を採集して持ち帰った。土壌は、試験研究目的の持ち込みとして輸入禁止品輸入許可申請手続きをあらかじめ行い、植物防疫法に基づき農林水産大臣の許可を受けて輸入した。

(2) マウス曝露実験

正常マウスに黄砂などを鼻から投与した後、麻酔下で屠殺して解剖し、肺組織を採取した。肺組織は一部をホルマリン固定、残りは凍結保存して解析に用いた。

(3) 細胞曝露実験

ヒト肺由来の細胞株と炎症細胞を培養し、粒子状物質などを曝露した後、細胞を回収し、DNA、タンパク質を抽出して解析を行った。顕微鏡観察用シャーレで培養した細胞に、被験物質を曝露した後、免疫染色により DNA 損傷の局在を解析した。

(4) 単離 DNA 損傷実験

大気汚染物質などを、中性緩衝液中試験管内でプラスミド DNA や放射性標識した単離 DNA と反応させ、電気泳動により DNA 損傷性を解析した。また、被験物質を仔牛胸腺 DNA と反応させた後、8-oxodG を定量解析した。

(5) 解析

組織学的解析:ホルマリン固定した肺組織はパラフィン包埋し、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および免疫染色を行い、顕微鏡観察した。炎症所見、DNA 損傷および関連因子の局在を解析した。

プロテオーム解析:肺組織からタンパク質を抽出し、蛍光標識 2 次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE 法)によって発現変動の解析を行った。別に 2 次元電気泳動を行い、CBB 染色して切り取ったスポットからタンパク質を抽出して、トリプシンによって消化処理し、ペプチドを MALDI/TOF/TOF で解析し、ペプチドマスフィンガープリンティング法による同定を行った。

8-oxodG 定量解析:肺組織および細胞からは、8-oxodG 測定用の市販キットを用いて DNA を抽出した。単離 DNA 損傷実験では、エタノール沈殿により被験物質を除去し、DNA を回収した。これら DNA を酵素処理して、ヌクレオチドに分解し、電気化学検出器付 HPLC により解析した。8-oxodG 生成量はピーク面積から dG に対する比として求めた。

4. 研究成果

(1) 黄砂投与マウスにおける肺障害

組織学的解析により、黄砂投与群の肺組織で炎症性細胞の浸潤と肺胞壁の肥厚が見られ、肺障害性を確認できた。肺組織の免疫染色により 8-oxodG の生成、iNOS の発現が傾向として認められた。この結果から、黄砂の吸入により肺組織に炎症が起こり、iNOS が発現して NO などの活性種が生成し、酸化 DNA 損傷が生じると考えられる。8-oxodG は変異原性があることから、黄砂の曝露は発がんに関与する可能性が示された。さらに、肺組織から抽出したタンパク質を、二次元電気泳動法による発現差解析 2D-DIGE および質量分析装置 TOF/MS/MS により解析した結果、抗酸化および抗腫瘍に関わるタンパク質のひとつが増加傾向にあり、酸化 DNA 損傷に対する防御反応と推察された。また、癌抑制に関わる可能性とヒト肺腫瘍での減少が報告されているタンパク質のひとつが減少傾向にあり、黄砂の肺腫瘍への関与を示唆するものと推察された。

(2) 微粒子の曝露による DNA 損傷

微粒子は吸入曝露による発がんリスクが懸念される。ナノ素材として最近利用が増えているカーボンブラックや多層カーボンナノチューブなどは、吸入曝露した実験動物に癌を引き起こす。粒子径が 56nm と 95nm のカーボンブラックを培養細胞に曝露した実験では、カーボンブラックが細胞に取り込まれて NO が産生し、8-ニトログアニン生成が増加することを明らかにした。また粒子径によって結果が異なることを示した。多層カーボンナノチューブを培養細胞に曝露した実験では、労働現場で起こりうる条件下で 8-ニトログアニンの生成が有意に増加し、その過程に TLR9 が関与することを初めて明らかにした。

(3) 大気汚染物質による DNA 損傷

大気汚染物質の成分に含まれるナフタレン、ナフトキノンおよびヒドロキシナフタレンは、飛来黄砂の粒子に付着している。ナフタレンは「ヒトに発がんの可能性あり」(IARC グループ 2B) に分類されており、ナフトキノンおよびヒドロキシナフタレンはナフタレンが生体内で代謝されてできる成分でもある。本研究では、ナフトキノンおよびヒドロキシナフタレンについて、DNA 損傷性と機序を解明するため、放射性標識した単離 DNA 断片を用いて解析した。1,2-ヒドロキシナフタレンと 1,4-ヒドロキシナフタレンは、銅イオン存在下で濃度依存的に酸化 DNA 損傷をもたらした。生体内還元物質 NADH を添加すると、1,2-ナフトキノンは顕著に DNA を損傷したが、1,4-ナフトキノンは損傷しなかった。これは 1,2-ナフトキノンの方が還元されやすいと考えられる。この酸化還元特性から、DNA 損傷機序において、1,2-ナフト

キノン/1,2-ヒドロキシナフタレンの方が重要である可能性を示した。(論文投稿中)

以上のように、本研究で、黄砂曝露による肺障害性、微粒子や大気汚染物質による酸化 DNA 損傷性とその機序の一端が明らかとなったことは、黄砂の発がんリスクを評価するうえで有用な知見とな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 19 件)

平工雄介、環境因子とマイクロ RNA : DOHaD 研究への応用と展望、日本衛生学雑誌 (印刷中) 査読有

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. 査読有

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 Feb 1;39:8. doi: 10.1186/s41021-016-0070-8. 査読有

The enhancement of oxidative DNA damage by anti-diabetic metformin, buformin, and phenformin, via nitrogen-centered radicals. Ohnishi S, Mizutani H, Kawanishi S. *Free Radic Res.* 2016 Aug;50(8):929-37. doi: 10.1080/10715762.2016.1204651. 査読有

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. 査読有

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. 査読有

Multi-walled carbon nanotube induces nitrate 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. 査読有

Epigenetic inactivation of follistatin-like 1 mediates tumor immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. Zhou X, Xiao X, Huang T, Du C, Wang S, Mo Y, Ma N, Murata M, Li B, Wen W, Huang G, Zeng X, Zhang Z. Oncotarget. 2016 Mar 29;7(13):16433-44. doi: 10.18632/oncotarget.7654. 査読有

Exposure assessment and heart rate variability monitoring in workers handling titanium dioxide particles-a pilot study. Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Wakai K, Ding X, Kobayashi T, Ichihara G. J. Nanopart. Res. 18: 52 (2016), 14pages. doi:10.1007/s11051-016-3340-2

Oxidative DNA damage induced by metabolites of chloramphenicol, an antibiotic drug. Ohnishi S, Murata M, Ida N, Oikawa S, Kawanishi S. Free Radic Res. 2015;49(9):1165-72. doi: 10.3109/10715762.2015.1050963. 査読有

The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L. Wang S, Mo Y, Midorikawa K, Zhang Z, Huang G, Ma N, Zhao W, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Oncotarget. 2015 Nov 3;6(34):35893-907. doi: 10.18632/oncotarget.5651. 査読有

Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Int J Mol Sci. 2014 Dec 24;16(1):193-217. doi: 10.3390/ijms16010193. 査読有

ほか7件。

[学会発表](計35件)

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)2017.3.28

平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺における遺伝子発現の網羅的解析、第 87 回日本衛生学会総会、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)2017.3.26-28

大西志保、平工雄介、平川和貴、及川伸二、村田真理子、川西正祐、発がん性ナフタレン代謝物による酸化的 DNA 損傷機構、日本環境変異原学会第 45 回大会、つくば国際会議場(つくば市)2016.11.17-18

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、浜松医科大学(浜松市)2016.11.12

大西志保、水谷秀樹、川西正祐、ピグアニド系糖尿病治療薬による酸化的 DNA 損傷の増強効果、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜市)2016.10.8

Yusuke Hiraku, Feiye Guo, Ning Ma, Tatsuhiko Yamada, Shumin Wang, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Nitrate DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. 11th International Particle Toxicology Conference, Singapore, Biopolis Matrix, 2016.9.26-30

平工雄介、繊維・粒子状物質による炎症と遺伝子損傷:発がんリスク評価と予防を目指して、第 5 回ナノカーボンバイオシンポジウム、札幌市、北海道立道民活動センターかでの 2・7、2016.9.6.

平工雄介、酒井潔、柴田英治、上島通浩、久永直見、村田真理子、ヒト肺組織における石綿繊維量とニトロ化 DNA 損傷との関連、第 62 回東海公衆衛生学会学術大会、穂の国とよはし芸術劇場プラット(豊橋市)2016.7.16

平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA と標的遺伝子の発現解析、第 89 回日本産業衛生学会、福島市音楽堂(福島市)2016.5.24-27

平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA 発現の網羅的解析と標的遺伝子の探索、第 86 回日本衛生学会

- 総会、旭川市民文化会館（旭川市）
2016.5.11-13
Tahmina Afroz、馬寧、川西正祐、村田真理子、平工雄介、インジウム化合物で処理したマクロファージ培養細胞におけるニトロ化 DNA 損傷、第 86 回日本衛生学会総会、旭川市民文化会館（旭川市）
2016.5.11-13
平工雄介、シンポジウム「出生前から生涯にわたる健康を守るための概念 DOHaD の実証研究 up-to-date」：環境因子とマイクロ RNA：DOHaD 研究への応用と展望、第 86 回日本衛生学会総会、旭川市民文化会館（旭川市）2016.5.11-13
大西志保、水谷秀樹、川西正祐、糖尿病治療薬による酸化的 DNA 損傷増強効果、日本薬学会 第 136 年会、パシフィコ横浜（横浜市）2016.3.29
大西志保、水谷秀樹、川西正祐、ピグアニド化合物による酸化的 DNA 損傷増強とラジカル生成、日本酸化ストレス学会東海支部 第 4 回学術集会、鈴鹿医療科学大学（鈴鹿市）2016.2.6
大西志保、水谷秀樹、川西正祐、ピグアニド系糖尿病治療薬による酸化的 DNA 損傷増強効果、日本環境変異原学会第 44 回大会、九州大学（福岡市）、2015.11.27-28
平工雄介、黒澤長之、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA 発現の解析と標的遺伝子の探索、日本産業衛生学会東海地方会、名古屋大学医学部（名古屋市）2015.11.14
大西志保、水谷秀樹、川西正祐、ピグアニド系糖尿病治療薬による酸化的 DNA 損傷増強効果と抗癌作用との関連、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場（名古屋市）2015.10.8
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：ToII 様受容体 9 の役割、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場（名古屋市）2015.10.8-10
平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA 発現の網羅的解析、第 88 回日本産業衛生学会、グランフロント大阪、大阪市、2015.5.13-16
大西志保、加古裕人、川西正祐、発がん性イチョウ葉エキス成分による酸化的 DNA 損傷、第 85 回日本衛生学会学術総会、和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国（和歌山市）2015.3.27
21 大西志保、馬寧、村田真理子、川西正祐、放射線によるエストロゲン依存性乳癌

- 誘発ラットにおける酸化ニトロ化ストレスと ALDH の役割、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）
2014.9.27
22 加古裕人、大西志保、原田均、里見佳子、川西正祐、発がん性イチョウ葉エキス含有成分による DNA 損傷性の比較研究、第 60 回日本薬学会東海支部総会・大会、鈴鹿医療科学大学（鈴鹿市）2014.7.5
23 浮氣良太、大西志保、原田均、里見佳子、坂晋、川西正祐、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおけるニトロ化 DNA 損傷と大腸発がん、第 60 回日本薬学会東海支部総会・大会、鈴鹿医療科学大学（鈴鹿市）2014.7.5
24 大西志保、井上純子、馬寧、角井綾希子、鶴飼聡、草深和弘、川西正祐、黄砂曝露マウスの肺における炎症および酸化的損傷、第 84 回日本衛生学会学術総会、岡山コンベンションセンター・岡山国際交流センター（岡山市）2014.5.26.
ほか 11 件。

〔図書〕
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

平工 雄介 (HIRAKU, Yusuke)
三重大学・医学系研究科・講師
研究者番号：30324510

(3) 連携研究者

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