

肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授

研究要旨

本研究は動物の肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的としている。これまでにラットにおいて、肺早期病変である過形成病変に対する Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化リスクの判別の可能性が明らかになった。これは DHPN 誘発ラット肺腫瘍と quartz 誘発ラット肺（炎症性病変）の比較により確認されたものである。今回は、DHPN 以外の発がん物質により誘導された肺過形成病変について、Napsin A が同様の染色性を示すか確認するための実験である。現在、動物実験は全 32 週を終え、病理組織切片の作成を完了したところである。

A．研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2 週間の飲水投与) が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約 30 週間と長期を要する。マウスでは、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で 12 週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、病変が消失するものと悪性化するものが混在している。特に、最近のナノテクノロジーの発展によって、ナノ粒子の吸入毒性が問題となっている。ナノ粒子の種類によっては時に過形成病変が発生する場合があります。この病変が、将来、腫瘍化リスクが高いのか否かを判別する方法も期待されている。

以上より、本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化リスクを予想可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、上記の期待に添えるのみでなく、早期病変での悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

これまでに、肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補の検索を目的とした研究を行ってきた。DHPN により誘発された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN 投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。検討した複数の抗体は Cyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin A および synaptophysin の 19 種類である。また、ラット肺の炎症性変化（炎症性過形成）についてもマーカーの発現を確認するための実験を行った。

各種微粒子 2mg を気管内投与後、28 日目のラット肺を用いてマーカーの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiO および CuO の 3 種類を用いた。これらの実験の結果、Napsin A が最有力候補として絞られた。

さらに、Napsin A は肺サーファクタント B の成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタントプロテイン (SP) の分子種である SP-A、B、C、D について染色を行い、napsin A の発現と比較検討を行った。用いた材料は DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍（腺系腫瘍、30 週）及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺（炎症性変化、28 日目）の固定標本である。

以上の実験から、Napsin A は、肺に発生する過形成病変の将来の腫瘍化リスクについての判別に有用であることが判明した。また、Napsin A の発現は肺サーファクタンとプロテイン-B の発現に若干の相同性を示した。

これまでの研究による Napsin A の有用性は、肺腫瘍誘発物質として、DHPN のみ使用した検討の結果である。今回の研究は、DHPN 以外の発がん物質（Urethane、dimethylnitrosamine (DMN)、Benzo[a]pyrene）により誘導された肺過形成病変についても Napsin A が同様の染色性を示すかについての確認を目的とした。

B. 研究方法

8週齢のF344ラット46匹を4群に分け、それぞれ1群:12匹、2群:13匹、3群:12匹、4群:13匹とした。実験開始の0週目から発がん物質を投与した。1群には水道水を溶媒とした0.1%DHPNをラットの自由に2週間飲水投与し、2群にはurethaneを1g/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g urethaneの濃度で溶解)で1週間おきに合計10回腹腔内投与した。3群では、実験開始時に30mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に30mg DMNの濃度で溶解)で単回の腹腔内投与を行った。4群には実験開始時にbenzo[a]pyreneを20mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g benzo[a]pyreneの濃度で溶解)で単回の気管内投与を行った。

なお、実験に用いた発がん物質の詳細な情報は以下のとおりである。

* DHPN: No.14027、ナカライテスク株式会社(京都)

* Urethane: CAS no. 51-79-6、東京化成工業株式会社(東京)

* DMN: CAS no.62-75-9、東京化成工業株式会社(東京)

* Benzo[a]pyrene: CAS no.50-32-8、sigma-aldrich Co.,LCC.(MO, USA)

実験開始16週目と32週目で各群約半数ずつ解剖を行い、解剖時には肺、肝、腎、膀胱、前立腺、胃、大腸を摘出した。肺では、肺内へのホルマリン注入固定と肺重量測定のため、以下の操作を行った。

(a) 摘出直後の心臓、胸腺、肺が一塊となった状態で重量を測定する。

(b) 肺に固定液を気管より注入する。肺に固定液を注入しない状態では肺胞が収縮した状態であり、病変(特に過形成)の診断が困難になる。ピンセットで気管切断口をつまんで閉じたまま、気管切断部よりやや尾側の気管本幹に注射針(25G針)を刺入する。全ての肺葉が膨らむまで固定液を注入する。注入しすぎると肺胞壁が破壊されるため、適切な圧での注入が要求される。

(c) 注入後、それぞれの肺葉を全て気管より切離し、6葉すべてを固定液中に浸漬する。気管、心臓、胸腺が残る。

(d) 残った心臓、胸腺、気管の重量を測定し、(a)から差し引くと正確な肺の実重量が算出される。

肝、膀胱、前立腺、胃、大腸については、本研究班の臓器取り扱いマニュアルに従って処理を行い、それぞれを分担研究者に送付した(napsin A以外の検討のため)。

(倫理面への配慮)

いずれの実験も動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

過去の文献に基づき、実験開始時、4群のbenzo[a]pyreneについて、70% ethanolを溶媒として使用する計画であった(20mg/kg body weightの用量、10ml 70% ethanol

に1g benzo[a]pyreneの濃度で溶解)。しかし、投与直後に死亡例が続出したため、急遽、溶媒を生理的食塩水に変更し同様の濃度、用量で投与を行った。この時、3匹が死亡し、4群について16週:5匹、32週:5匹(合計10匹)の計画に変更した。実験開始日に4群で3匹死亡例が発生したが、それ以外に死亡例はない。

16週目では最終的に、1群:6匹、2群:6匹、3群6匹、4群:5匹を解剖した。16週解剖時の体重および臓器重量を表1に示した。体重では、3群(DMN)および4群(Benzo[a]pyrene)と比べ2群(urethane)では有意な減少を認めた。相対肺重量は、4群と比べ1群では有意な上昇が見られた。その他の項目に群間で有意な差は認められなかった。

16週目における摘出肺の肉眼所見は、3群(DMN)を除くすべての群で、肺表面が粗造な印象であった(図1)。また、1群(DHPN)、2群(urethane)、3群(DMN)のいずれも、肺表面に小結節が認められた。組織学的には1群ではhyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltrationが、2群ではhyperplasia lymphocyte infiltrationが、3群と4群ではhyperplasiaが見られた(図2)。Hyperplasiaは形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。肉眼的、組織学的評価のまとめを表2に示した。

32週目では最終的に、1群:5匹、2群:6匹、3群6匹、4群:5匹を解剖した。32週解剖時の体重および臓器重量を表1に示した。体重では、各群間に有意差は認められなかった。絶対及び相対肺重量は、2群および4群と比べて1群では有意な上昇が見られた。その他の項目に有意な群間差は認められなかった。

32週目における摘出肺の肉眼所見は、すべての群で、肺表面が粗造な印象であった(図3)。組織学的には1群および3群ではhyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltrationが、2群および4群ではhyperplasia、lymphocyte infiltrationが見られた(図2)。Hyperplasiaは形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。肉眼的、組織学的評価のまとめを表2に示した。

D. 考察

現在、16週および32週の解剖を終了し、病理組織学切片(HE切片)が完成したところである。予想に反して、2群(urethane)では16週でhyperplasiaが1匹に見られるのみであった。2群において、肉眼的に確認された小結節は、病理組織学的にはリンパ球浸潤巣であったと推移された。4群(benzo[a]pyrene)でも、炎症性過形成病変が見られた。

今後、Napsin Aの免疫染色を施行予定である。また、他の分担担当者も標的臓器は異なるが、多種の発がん物質を投与する検討を予定しており、肺について増殖性病変が発生した場合、それについてもNapsin Aの検討を行う予定である。これまで、膀胱腫瘍をターゲットにした多種発癌剤投与後6週のラット肺組織が送られてきたが(国立医薬品食品衛生研究所、小川久美子先生より)、組織学的に肺の増殖性病変は確認できなかった。

E . 結論

肺過形成の腫瘍化リスクの判別における Napsin A の有用性の検証を目的に実験を行っている。多種の肺発がん物質（DHPN、Urethane、DMN、Benzo[a]pyrene）により誘導された肺過形成病変について、Napsin A 様の染色性の検討を予定している。実験中間時期である 16 週の剖検を終了したところであるが、16 週について、2 群（urethane）および 4 群（benzo[a]pyrene）の増殖性病変の発生が不良であった。現在も順調に実験は進行中であり、32 週の剖検終了後に 16 週の肺と合わせて同一条件で Napsin A の免疫染色を行う予定である。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66: 117-123, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3-4):175-182, 2014.

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし