

平成27年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:カーボンナノマテリアル肺内投与に伴う肺病変とサイトカイン発現との関連

分担研究者 酒々井眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 教授
研究協力者 二口充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 准教授
深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 講師
吉本恵里 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 技術職員

研究要旨

ヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築を目的として本研究では多層カーボンナノチューブ(MWCNT-N)のラット肺内投与に伴う肺障害とサイトカイン発現との関連を解析した。MWCNT-Nをflow through(FT)分画、primary mixed(P)分画、remaining(R)分画に分け、各分画をラット肺内に投与後2年経過の肺組織を検体として用いた。分画後の平均長(μm , mean \pm SD)はそれぞれ2.6 \pm 2.9、4.2 \pm 1.6、 $>$ 2.6、肺組織中の平均長はそれぞれ2.6 \pm 0.8、2.7 \pm 1.0、3.1 \pm 0.9であった。平均長に大きな差は認めなかったことから、投与されたMWCNTは形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留したと考えられ、その平均長は2.6 μm 以上である。サイトカイン/ケモカインの持続的な発現が、肺がんの発生に關与しているか否かを調べるために2年経過後に発生した腫瘍のサンプルを用いて腫瘍組織中の発現レベルを解析した。我々の先行研究により肺発がんとの関連が示唆された4つのサイトカイン(Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4)を解析対象として、凍結サンプルからtotalRNAとタンパクを抽出し半定量的RT-PCRアッセイおよびwestern blotアッセイにて各分画ごとのmRNAおよびタンパク発現レベルを調べた。各サンプルは中分化腺がん(moderately differentiated adenocarcinoma)あるいは肉芽腫(granuloma)であった。がん組織ではCsf3およびIL6のmRNA発現が溶媒対照群よりも2~5倍有意に増加していた。Csf3、Cxcl2およびCcl4のタンパク発現は溶媒対照群に比べ6~11倍有意に高い値を示した。一方、肉芽腫では溶媒対照群よりも低値であった。まとめると、本実験システムにおいて平均長2.6 μm 以上のMWCNT投与52週経過後の時点では腫瘍は発生せず、平均して90~100週経過後に腫瘍が発生するので52~90週目までの期間に、Csf3、Cxcl2およびCcl4は発がんプロモーション効果を発揮する可能性がある。これらの3つのサイトカイン/ケモカイン発現は腫瘍組織でも有意に高値を示している。よって65週以上の炎症の持続とCsf3、Cxcl2およびCcl4の発現レベル増加は肺発がん重要な役割を果たしている。

A. 研究目的

ヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築を目的として本研究では、MWCNT の肺内投与に伴う炎症および腫瘍性病変とサイトカイン/ケモカイン発現の関連を調べた。MWCNT 投与後 2 年経過した時点で生存したラット肺組織を検体にサイトカイン/ケモカイン IL6、Csf3、Cxcl2 および Ccl4 の mRNA/タンパク発現レベルを解析した。

B. 研究方法

本研究では日機装社製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N) を用いた。MWCNT-N を 25 mm mesh の篩(ふるい)により各分画 flow through (FT)、primary mixed (P)、remaining (R) に分け、ラット肺内に投与後 2 年経過の肺組織を検体として用いた。組織学的検索には HE 染色を行った。非腫瘍組織は各群 3~5 匹、腫瘍組織は 2 匹から凍結検体を採取した。腫瘍組織では凍結検体をホルマリン固定し HE 染色することで正確に診断した。各検体から totalRNA およびタンパクを抽出し半定量的 RT-PCR アッセイおよび western blot アッセイにて各分画ごとの mRNA およびタンパク発現レベルを調べた。解析対象のサイトカイン/ケモカインは先行研究にて初代培養肺 macrophage に MWCNT-N をばく露し網羅的にスクリーニング (Toray3D-GeneChip 20k) した結果発現量の高かった Csf3 (colony stimulating factor3)、IL6 (interleukin6)、Ccl4 (macrophage inflammatory protein1beta)、Cxcl2 (macrophage inflammatory protein2) とした。Total RNA を trizol reagent を用いて抽出し oligo dT primer (Invitrogen) にて cDNA を合成後、これを template として DNA を合成、発現レベルを actin にて標準化した (ImageJ)。タンパクを RIPA lysis buffer にて抽出し SDS-PAGE 後に各 1 次抗体にて反応させ発現レベルを actin にて標準化した。1 個体につき複数の検体を採取し、各検体につき複数回アッセイすることで発現量を平均した。使用した 1 次抗体は Csf3 (sc13102, 200 倍希釈, SantaCruz)、

IL6 (RD53324, 250 倍希釈, RD Systems)、Ccl4 (GTX45129, 2000 倍希釈, GeneTex)、Cxcl2 (GTX29777, 1500 倍希釈, GeneTex)、actin (A5441, Sigma) である。mRNA およびタンパク発現量の検定には、Dr.SPSS II (SPSS) を用い等分散性の検定には Levene 検定、3 群以上の平均値の比較に一元配置分散分析 one-way ANOVA を用いた。等分散の多事比較には Bonferroni の多重比較および Dunnett 法を用いた。不等分散の多重比較には Dunnett' C 法および Games-Howell 検定を用いて統計学的解析を行った。P<0.05 を有意差があると判定した。以下の文章で発現量とするのは各検体の発現量/actin の平均値である。

(倫理面への配慮)

我が国の「動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105) 並びに「動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号) を遵守し、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った (H22M-19)。

C. 研究結果

分画後の平均長 (μm , mean \pm SD) は FT: 2.6 \pm 2.9、P: 4.2 \pm 1.6、R: >2.6、肺組織中の平均長は FT: 2.6 \pm 0.8、P: 2.7 \pm 1.0、R: 3.1 \pm 0.9 であった。非腫瘍組織の mRNA 発現量: Csf3 発現量は VEH (溶媒対照群) と比較すると、P 分画および FT 分画で低く、R 分画において高かった。IL6 発現量は VEH と比較すると、P 分画において低かった。FT 分画においてわずかに高く、R 分画において低かった。Cxcl2 では、VEH に比べ P、FT、R 分画においていずれの mRNA 発現量は高かった。Ccl4 発現量は P 分画において低く、FT 分画では高く、R 分画において低かった。FT 分画は Notx (無処置群) に比べ有意に高かった

($P<0.05$)。

非腫瘍組織のタンパク発現量: Csf3 発現量は VEH (溶媒対照群)と比較すると、P 分画において高く、FT 分画においてわずかに高く、R 分画において低かった。IL6 では VEH に比べ P, FT, R 分画においていずれも低かった。Cxcl2 発現量は VEH と比較すると、P 分画において低く、FT 分画において高く、R 分画ではわずかに低かった。Ccl4 発現量は VEH と比較すると、P 分画および FT 分画において高く、R 分画では低かった。Notx (無処置群)よりも高い発現を示したのは Csf3 の P 分画のみであった。

腫瘍組織の mRNA およびタンパク発現量: 計 15 匹のラットの中で実験終了時まで生存し屠殺時に結節性病変が確認された個体は 2 匹 (個体 A と B とする、共に R 分画投与)であった。この個体の結節性病変より凍結組織を採取、解析に用いた。個体 A では 4 個、個体 B では 2 個の結節性病変が観察された。個体 A に観察された 4 個の結節 (A1 ~ A4) は、組織学的にはいずれも中分化型の腺がんであった。個体 B で観察された 2 個の結節性病変 (B1, B2) のうち、1 つは肉芽腫 (B1) で、1 つは中分化型腺がん (B2) であった。VEH (溶媒対象) および Notx (無処置) 群のラットの肺組織には、結節性病変も炎症性変化も観察されなかった。各腺がん組織の Csf3 および IL6 の mRNA 発現量は、VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ A1 ~ A4 で 2 ~ 5 倍、B2 で 2.5 倍高かった ($P<0.05$)。肉芽腫 B1 発現量は VEH より低値であった。Cxcl2 および Ccl4 の発現量は VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ同等か低値であった。各腺がん組織の Csf3、Cxcl2 および Ccl4 のタンパク発現量は、VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ A1 ~ A4 では 6 ~ 11 倍、B2 は 10 ~ 11 倍高かった ($P<0.05$)。肉芽腫 B1 発現量は VEH より低値であった。IL6 の発現量は VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ同等か低値であった。

D. 考察

本研究では、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺内投与に伴う肺病変 (炎症および腫瘍) とサイトカイン発現との関連について調べた。肺内投与前の液相分離での MWCNT の平均長は 2.6 ~ 4.2 μm 、実際に肺内に存在した MWCNT の平均長は 2.6 ~ 3.1 μm であった。平均長に大きな差は認めなかったことから、投与された MWCNT は形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留したと考えられ、その平均長は 2.6 μm 以上である。

我々の先行研究で、ラットの初代培養肺マクロファージを作成し MWCNT をばく露しマイクロアレイ解析により 25,000 遺伝子の中で発現量の高かった 2 つのサイトカイン (Csf3, IL6) および 2 つのケモカイン (Cxcl2, Ccl4) に本研究では着目した。Csf3、Cxcl2、Ccl4 のタンパク発現は MWCNT 投与後 1 年経過まで炎症の存在とよくリンクしていた (我々の先行研究)。本研究を始めた時点では、25 μm メッシュで分画化した MWCNT の平均長に依存して炎症の程度とサイトカイン/ケモカイン発現への影響が異なると予測していた。しかし、炎症の程度 (我々の先行研究) およびサイトカイン/ケモカイン発現 (本研究) について分画間で一定の差はみられなかった。よって、今回の実験で試験した平均長 2.6 ~ 4.2 μm の MWCNT の肺内投与では炎症とサイトカイン/ケモカイン発現に対してサイズに依存した影響は少ないと考えられる。

MWCNT 投与 2 週間経過後では VEH 群よりも高い値を示していた mRNA は Csf3 および Ccl4、タンパク発現では Csf3、Cxcl2 および Ccl4 であった。1 年経過後も mRNA あるいはタンパクが持続的に発現しているものは Csf3、Cxcl2 および Ccl4 であり、これらは炎症や肉芽腫の惹起に関連していると考えられる。これら 3 種類のサイトカイン/ケモカインは好中球の役割に関わるものである。好中球は異物を認識し、異物除去を行う。本研究では、ラット肺胞マクロファージが

MWCNT を貪食し、マクロファージにより放出された Csf3 が好中球の増殖動員および機能強化を行いケモカイン Cxcl2 および Ccl4 により好中球および単球が遊走しマクロファージさらに動員するという循環が生じると考えられる。肺組織での持続的な炎症像とサイトカイン/ケモカイン発現プロファイルはこの循環状態を反映している。MWCNT 投与 1 年経過後の時点では腫瘍は発生せず、平均して 90 ~ 100 週経過後に腫瘍が発生するので 52 ~ 90 週目までの期間に Csf3、Cxcl2 および Ccl4 は発がんプロモーション効果を発揮する可能性がある。

まとめると、少なくとも本実験システムにおいて MWCNT の肺内投与は炎症と腫瘍(中皮腫、原発性肺がん)を誘発する。炎症は 1 年経過後も持続してみられ Csf3、Cxcl2 および Ccl4 のタンパク発現状況と炎症像はリンクしていると考えられる。これらの 3 つのサイトカイン/ケモカイン発現は腫瘍組織でも有意に高値を示している。よって 65 週以上の炎症と Csf3、Cxcl2 および Ccl4 の発現レベル増加は肺発がん重要な役割を果たしている。

E. 結論

投与された平均長 2.6 μm 以上の MWCNT は形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留する。平均長 2.6 ~ 4.2 μm の MWCNT の肺内投与では炎症とサイトカイン/ケモカイン発現に対してサイズに依存した影響は少ない。65 週以上の炎症と Csf3、Cxcl2 および Ccl4 の発現レベル増加は肺発がん重要な役割を果たしている。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzui M., Futakuchi M, Fukamachi K,

Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*, Epub, 2016.

2. Futakuchi M, Fukamachi K, Suzui M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, Epub, 2015.
3. Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Erces D, Tokes T, Meszaros A, Kaszaki J, Suzui M., Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol*, Epub, 2015.
4. Shibata K, Fukamachi K, Tsuji A, Saga T, Futakuchi M, Nagino M, Tsuda H, Suzui M. *In vivo* ^{18}F -fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human *Kras*^{G12V} oncogene. *Oncol Lett*, 9: 2112-2118, 2015.
5. Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y,

Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Hirose A, Kanno J, Nakae D, Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci*, 106: 825-832, 2015.

2. 学会発表

1. 松本晴年、木村和哲、酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉(バショウ)抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第 136 年会; 横浜: 2016 年 3 月 29 日
2. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Anticancer mechanism of action of palmitoyl piperidinopiperidine. 平成 27 年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016 年 2 月 3 日
3. 加賀志稀、安藤さえこ、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Relationship between pulmonary lesions induced by intrapulmonary instillation of multiwall carbon nanotubes and expression status of specific cytokines. 平成 27 年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016 年 2 月 3 日
4. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響. 第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 高松: 2016 年 1 月 28 日
5. 松本晴年、木村和哲、酒々井眞澄. Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells. 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2015; 名古屋: 2015 年 11 月 1 日
6. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 新規物質パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性の検証. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 9 日
7. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット膵がんの治療効果判定に有用な血清マーカー. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
8. 酒々井眞澄、安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、深町勝巳、二口充. 新規大腸がん治療薬パルミトイルピペリジン誘導体の開発. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
9. 二口充、深町勝巳、酒々井眞澄. 骨微小環境におけるがん幹細胞の悪性形質発現のメカニズム. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
10. 加賀志稀、安藤さえこ、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブによる肺障害性および特異的サイトカイン発現への影響. 平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015 年 9 月 3 日

11. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性. 平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015 年 9 月 3 日
12. Saeko Ando, Shiki Kaga, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Masumi Suzui. Anticancer activity of palmitoyl piperidinopiperidine. 第 30 回発癌病理研究会; 小豆島: 2015 年 8 月 28 日
13. 加賀志稀、安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Effecton profiles of specific cytokines and pulmonary injury induced by instillation of multiwall carbon nanotube. 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
14. 安藤さえこ、加賀志稀、松本晴年、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Anticancer activity of a novel compound palmitoyl piperidinopiperidine. 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
15. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells. 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
16. 加賀志稀、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブの肺障害性と遺伝子発現への影響. 第 42 回日本毒性学会学術年会; 金沢: 2015 年 6 月 29 日
17. Shiki Kaga, Saeko Ando, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui. Effects of multiwall carbon nanotube on the pulmonary injury and expression status of specific cytokines. The 7th International Congress of Asis society of Toxicology; Jeju Island, Korea: Jun, 25th, 2015.
18. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 新規抗がん物質の個体レベルにおける効果の検証. がん予防学術大会 2015; 埼玉県さいたま市: 2015 年 6 月 5 日
19. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉 (バショウ、*Musa basjoo*) 抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第 135 年会; 神戸: 2015 年 3 月 28 日
20. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミチン酸誘導体の in vivo 抗がん効果. 個体レベルでの癌研究の新展開; 大津: 2015 年 2 月 6 日
21. 加賀志稀、安藤さえこ、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブの長さの違いによる肺障害と遺伝子発現への影響. 個体レベルでの癌研究の新展開; 大津: 2015 年 2 月 6 日
22. 酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル. 第 31 回日本毒性

病理学会総会及び学術集会; 江戸川: 2015
年 1 月 30 日

23. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄、
血清診断マーカーN-ERC/mesothelin によ
る抗がん剤の治療効果の判定. 第 31 回日
本毒性病理学会総会及び学術集会; 江戸
川: 2015 年 1 月 30 日

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願 2015-070424、抗がん剤、出願 2015 年 3 月
30 日、発明者: 酒々井眞澄、飯沼宗和、出願人: 公
立大学法人名古屋市立大学、日油株式会社