

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 以外の種々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ことが確認された。また、ラットに加えて、マウスでも発がん物質による肺過形成病変の Napsin A の染色性が確認された。

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、上記の期待に応えるのみでなく、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、ラット肺の炎症性病変（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（炎症性病変、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）により誘導されたラットの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。さらに、マウスについても検証を行った。種々の発がん物質として、urethane、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)、Benzo[a]pyrene を用いて誘発した病変に対して検討を行った。

B . 研究方法

実験 1

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)

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。

実験 2

7 週齢の A/J マウスに 1 群 : urethane 5.0mg/head、2 群 : NNK 2.0mg/head、3 群 : benzo[a]pyrene 1.0mg/head をそれぞれ腹腔内投与し、26 週後に実験終了した。以上は日本たばこ産業株式会社で行われ、各群 5 匹ずつの肺のパラフィンブロックを借用し検討を行った (無償貸与)。

免疫組織学的検討

Napsin A の染色に関しては、実験 1 のラット肺については、NCL-L-Napsin A (Liquid concentrated monoclonal antibody) (Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK) を 1:100 の希釈倍率 (15 分) で染色した。実験 2 のマウス肺では、rabbit anti-napsin A polyclonal antibody (bs-4753R, Bioss antibodies, MA, USA) を 1:50 の希釈倍率 (1 時間) で染色した。

C . 研究結果

実験 1

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。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。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。

Napsin Aの発現について、DHPN、MNU、Urethane誘発のhyperplasiaにはNapsin Aの壁内高発現が認められた。正常上皮の発現と比較して発現が上昇していた(図1)。炎症性と思われるhyperplasia(Urethane、Benzo[a]pyrene誘発)にもNapsin Aの壁内発現が見られたが、正常上皮の発現と比べてコントラストは乏しい印象であった。

実験2

Urethane, NNK, B[a]Pに誘発されたHyperplasiaおよびadenomaにおいて、Napsin Aの肺胞壁内における高発現が確認された(図2)。この高発現は、正常肺胞壁と比較し、顕著に認められた。以上の所見はラットの肺過形成におけるNapsin Aの陽性所見とほぼ同様の印象であった。

D. 考察

各発癌物質に誘発されたhyperplasiaにおいて、ラットおよびマウスともNapsin Aの肺胞壁内の高発現が確認された。Napsin Aは2型肺胞上皮に由来している。肺胞壁内で2型肺胞上皮が増殖する過形成は、腫瘍化能が高いと推測される。炎症性過形成の場合、肺胞壁で増殖している細胞は血管内皮細胞や組織球、線維芽細胞が推測され、Napsin Aの発現は低いと考えられる。今回、炎症性hyperplasiaの検討は実施できていないが、マウスの炎症性hyperplasiaは比較的発生頻度が低いいため、今後の検討課題と言える。

また、他の分担担当者について、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いる。肺について増殖性病変が発生した場合、今後もNapsin Aの検討を行う予定である。本年度、分担研究者より(国立医薬品食品衛生研究所、小川久美子先生)膀胱腫瘍をターゲットにした多種発癌剤投与後6週のラット肺組織の送付をいただいたが、組織学的に肺の増殖性病変は確認できなかった。

一方で、分担研究者は超早期マーカーとしてH2AXの有用性について研究を行っている。形態的な変化の見られない、超早期の肺についても腫瘍化の可能性が高い場合には、H2AXの発現が見られる可能性がある。肺におけるH2AXの有用性の有無について何らかの結論を出すことを今後の検討課題としたい。

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た。ラットにおけ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、マウスにおいてUrethane, NNK, B[a]Pに誘発された肺過形成病変のいずれも、Napsin Aの肺胞壁内高発現が確認された。ラットおよびマウスの過形成性病変におけるNapsin Aの高発現は将来の腫瘍化を示唆することが明らかになった。早期肺病変としての可逆性過形成と腫瘍性過形成の鑑別が可能であり、肺動物モデル試験系において有用なマーカーと期待される。

形態的な変化は見られないが、腫瘍化の可能性が高い実験早期の肺にH2AXの発現が見られる可能性があり、今後の検討課題としたい。

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

横平政直; 山川けいこ; 中野裕子; 沼野琢旬; 岸宗佑; 二宮芙美子; 竿尾光祐; 今井田克己、Immunohistochemical characteristics of surfactant protein A, B, C and D in the lung of F344 rats., 第72回日本癌学会学術総会、2013.10

横平政直; 山川けいこ; 木内茂巳; 中野裕子; 二宮芙美子; 岸宗佑; 竿尾光祐; 今井田克己、Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats., 第71回日本癌学会総会、2012.09

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし