

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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。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。さらに、DHPN 以外にも種々の発がん物質により誘導されたラットおよびマウスの肺過形成病変について、Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現が確認された。また、他の分担研究者が注目している H2AX について、これまでの実験での材料を用いて肺での発現に関する検討を行った。しかしながら、発癌物質投与による H2AX の発現率の差は認められなかった。

**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 週間と長期間を要する。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、早期に気管支肺胞上皮過形成（以下、過形成）が出現するが、将来、その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、この病変が、将来に腫瘍化する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。その結果、染色性から Napsin A が最有力候補として絞られた。

Napsin A は肺胞サーファクタント 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トプロテイン-B の発現に若干の相同性を示した。

さらに、Napsin A の有用性に関する検証の実験も行った。ラットにおける多種の肺発がん物質（DHPN、Urethane、N-Nitrosodimethylamine(DMN)、Benzo[a]pyrene(B[a]P)）により誘導された肺過形成病変、およびマウスにおける 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。以上より、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潜在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た。

今回は、他の分担研究者が早期の腫瘍マーカーとして期待している H2AX についての実験を行った。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 の発現上昇が見られる可能性がある。これまでにを行った実験の肺標本を用いて、形態的に異常の見られない肺胞上皮における H2AX の発現について検討を行った。

## B. 研究方法

2006年～2014年に当教室で実施した6週齢または7週齢で開始したF344ラットによる実験の肺ブロック標本を用いて検討を行った。用いた肺ブロック材料の実験内容の要旨を表1に示す。各群、3匹ずつの肺について検討した。

### 免疫組織学的検討

H2AXの染色に関して、抗体は、Phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody (Cell Signaling, MA, USA)を用いた。すべての染色行程はペントナ自動免疫染色装置 (VENTANA Discovery XT system, VENTANA medical Systems, AZ, USA)を使用した。クエン酸buffer (CC2 extended (90分))で抗原賦活化を行い、1次抗体は10倍希釈で60分、2次抗体 (rabbit) は30分反応させた。

形態的に変化の見られない肺胞上皮について、細胞1000個以上あたりのH2AX陽性細胞数を計測し、その割合 (%) を算出した。

### (倫理面への配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、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総合生命科学研究センター、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

気管支肺胞腺腫 (adenoma) においては、H2AX発現細胞が多く認められた (図1)。一方、正常肺胞上皮については陽性細胞が散見されるのみであった。これらの陽性細胞数を集計したものが表2である。今回の12週以降の検討では、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。06CB2の実験は経時的な変化を検討するものであり、DHPN投与後、H2AXの経時的発現変化についての結果が期待された。しかしながら、その発現率に変化は認められなかった。また、実験ごとに、H2AXの発現に差が見られた。特に、2014年の実験である14EX1は、2006年の実験である06CB2に比べてH2AX発現細胞率が高い。それらの2つの実験は、DHPNの投与期間および投与方法、実験期間、採取組織の固定時間および切片作成方法は同様であった。

## D. 考察

今回、発癌物質投与後のラット正常肺胞上皮におけるH2AXの発現率に関する検討を行った。発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。これは、H2AXがかなり早期に発現し、今回検

討した12週以降には発現がすでに低下している可能性が推測される。今後はより早期に評価する動物実験を計画し検討する必要があると考えられた。

また、同内容の実験でも実験を行ったタイミングでH2AX陽性細胞率に変化が見られた。これは古い実験ほどH2AXの発現率に低下が見られ、ブロックの保存期間が発現に影響を与える印象であった。

## E. 結論

今回、発癌物質投与後のラット正常肺胞上皮におけるH2AXの発現率に関する検討を行ったが、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。今後はより早期に評価する動物実験を計画し検討する必要があると考えられた。

また、H2AXの発現率の検討には、ブロックの保存期間も重要であることが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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.

2) 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

1) 横平政直; 成澤裕子; 山川けいこ; 蟹江尚平; 橋本希; 今井田克己、A possible predictable marker, napsin A, for the tumorigenic potential of lung bronchio-alveolar hyperplasia in rodents.、第75回日本癌学会学術総会、2016.10

2) 中野裕子; 横平政直; 山川けいこ; 岸宗佑; 蟹江尚平; 塩岡忠夫; 竿尾光祐; 今井田克己、ラット肺およびヒト tissue microarray におけるH2AXの発現、第73回日本癌学会学術総会、2014.9

- 3) 横平政直; 山川けいこ; 中野裕子; 沼野琢旬; 岸宗佑; 二宮英美子; 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
- 4) 横平政直; 山川けいこ; 木内茂巳; 中野裕子; 二宮英美子; 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

## G . 知的財産権の出願・登録状況

### 1 . 特許取得

なし

### 2 . 実用新案登録

なし

### 3 . その他

なし

表1 今回の検討で用いた肺ブロック材料についての情報

Exp. Code	Year	Animal	Age	Experiment	Used animals		
					Treatment	No.	Exp. period
06CJ	2006	F344, F	7 weeks	Toxicity study of asperagine	Untreated	3	90days (13weeks)
06CB3	2006	F344, M	6 weeks	Promotion study of nanoparticle	Untreated	3	23 weeks
14EX	2014	F344, M	6 weeks	DHPN, Urethane, DMN, B[a]P	DHPN	3	16 weeks
14EX	2014	F344, M	6 weeks	DHPN, Urethane, DMN, B[a]P	Urethane	3	16 weeks
14EX	2014	F344, M	6 weeks	DHPN, Urethane, DMN, B[a]P	DMN	3	16 weeks
14EX	2014	F344, M	6 weeks	DHPN, Urethane, DMN, B[a]P	B[a]P	3	16 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30 weeks	DHPN	3	12 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	DHPN	3	16 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	DHPN	3	23 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	DHPN	3	30 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	NNK	3	12 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	NNK	3	16 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	NNK	3	23 weeks
06CB2	2006	F344, M	6 weeks	DHPN or NNK, 12~30weeks	NNK	3	30 weeks

表2 正常肺胞上皮における H2AX の発現率

Exp. Code	Treatment	No.	$\gamma$ H2AX Index (%)*													
			12w	13w	16w	23w	30w									
06CJ	Untreated (Asperagine)	3	1.4 $\pm$ 0.5													
06CB3	Untreated	3	6.4 $\pm$ 2.8													
14EX	DHPN	3	24.6 $\pm$ 10.4													
14EX	Urethane	3	21.6 $\pm$ 2.1													
14EX	DMN	3	25.7 $\pm$ 1.9													
14EX	Benzo	3	22.4 $\pm$ 2.8													
06CB2	DHPN	3	5 $\pm$ 2.4													
06CB2	DHPN	3	7.5 $\pm$ 3.1													
06CB2	DHPN	3	3.1 $\pm$ 4.1													
06CB2	DHPN	3	3.7 $\pm$ 2.9													
06CB2	NNK	3	3.4 $\pm$ 2.3													
06CB2	NNK	3	4.1 $\pm$ 1.3													
06CB2	NNK	3	2.3 $\pm$ 1.7													
06CB2	NNK	3	1.9 $\pm$ 0.7													
* Counted at least 1000 cells.																

図1 ラット、気管支肺胞腺腫における  $\gamma$ H2AX の発現 (14EX DHPN, 16w)

