

令和2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：気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究
：迅速化かつ国際化に向けてに関する研究

分担研究課題名 被検物質の DNA 障害性の解析に関する研究
分担研究者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

これまでに、津田グループが独自に開発した実施容易な経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて実施された毒物劇物を含む物質の急性毒性に関わる毒性について、マイクロアレイ解析による解析を試みて有害性評価に適用して発展させようとするものである。手法の開発においては JBRC にて LC50 について試験された 1) 4-ジオキサン、2) グリシドール、3) *N,N*-ジメチルホルムアミド、4) アクリル酸ポリマー、5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、7) *N,N*-ジメチルアセトアミド等について発がん性のデータを得る方法についてマイクロアレイ解析を試みている。それに先立ち津田研究室にて実施してきたカーボンナノチューブについての解析を施行してデータを取り、短期毒性の評価と同時に肺と胸膜中皮に対する発がん性の見られたマ40層の多層カーボンナノチューブ MWCNT-7 および 2 層の DWCNT について、気管内投与で誘発したラット肺腫瘍および中皮腫についてマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を実施し、腫瘍のアレイ解析を行った。その結果、DWCNT 誘発肺腺癌で 1028 個、MWCNT-7 誘発肺腺癌で 906 個、MWCNT-7 誘発した中皮腫で 1047 個の遺伝子が 2 倍以上の発現変動を認めた。また、DWCNT、MWCNT-7 で誘発された肺腺癌において、共通の発現変動が認められた遺伝子は 301 個存在した。MWCNT-7 で誘発された肺腺癌と中皮腫の遺伝子発現変動を比較した結果、共通の変動が認められた遺伝子は 230 個であったが、それぞれ特異的な変動が見られた遺伝子は 590 および 815 個であった。さらに、肺腺癌においては誘発物質が異なるにもかかわらず、多くのパスウェイが共通していることがわかった。一方、MWCNT-7 誘発中皮腫では、Actin Cytoskeleton Signaling や Calcium Signaling などのパスウェイの活性化がみられ、肺腺癌とは異なることが判明した。以上より、異なる種類のカーボンナノチューブで誘発したラット肺発がんには共通する発がん機序が存在することが示唆された。現在、上記 7 物質についてについて解析の可能な物質から解析を試みている。

A. 研究目的

カーボンナノチューブは、生体内においてアスベストに似て難分解性で、マクロファージの胞体内や、肺および胸膜組織、縦隔リンパ節に沈着して強い持続性異物炎症を誘発するために、発がんの可能性が懸念されてきた。これまでに、津田グループが独自に開発した実施容易な経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて、40 層の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) である MWCNT-7、およびそれに比べてはるかに層数の薄い 2 層の DWCNT において、肺または胸膜中皮に発がん性があることを明らかにしてきた。本研究ではこれらのマイクロアレイ解析による解析を、日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて実施された毒物劇物を含む物質の急性毒性に関わる毒性について試みて有害性評価に適用して発展させようとするものである。

B. 研究方法

凍結腫瘍組織および非癌部組織から、RNase Mini Kit (Qiagen社)を用いて、total RNAを精製・抽出した。解析材料は以下の通り：DWCNTで誘発した肺腺癌1例 (D7-Adc) および同個体の非癌部 (D7-N)；MWCNT-7で誘発した肺腺癌1例 (M7-Adc) および同個体の非癌部 (M7-N1)；DWCNT-7で誘発した中皮腫1例 (M7-MM) および同個体の非癌部 (M7-N2)；無処置ラット (溶媒群) の肺組織3例

(Con.)。各組織から得られた total RNA に対して、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Affymetrix社)を用いたマイクロアレイ解析を行った。得られた遺伝子発現データについて、Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Qiagen社)を用いて解析した。

C. 研究結果

腫瘍および非腫瘍部における遺伝子発現差を確認した結果、DWCNT 誘発肺腺癌で 1028 個、MWCNT-7 誘発肺腺癌で 906 個、MWCNT-7 誘発した中皮腫で 1047 個の遺伝子が 2 倍以上の発現変動を認めた。また、DWCNT および MWCNT-7 で誘発された肺腺癌において、共通の発現変動が認められた遺伝子は 301 個存在した。

MWCNT-7 で誘発された肺腺癌と中皮腫の遺伝子発現変動を比較した結果、共通の変動が認められた遺伝子は 230 個であったが、それぞれ特異的な変動が見られた遺伝子は 590 および 815 個であった。

各腫瘍における活性化および不活性化 (青色) されているパスウェイを図 1 に示す。各腫瘍におけるパスウェイを比較したところ、3つの肺腺癌においては誘発物質が異なるにもかかわらず、多くのパスウェイが共通していることがわかった。一方、MWCNT-7 誘発中皮腫では、Actin Cytoskeleton Signaling、Calcium

Signaling、ILK Signaling、GP6 Signaling、PAK Signaling などのパスウェイの活性化がみられ、肺腺癌とは異なることが判明した。

図1 各腫瘍におけるパスウェイの比較

D. 考察

DWCNT および MWCNT-7 で誘発した肺腺癌において認められた遺伝子発現変動と、変化を認めたパスウェイに共通するものが多く存在することから、カーボンナノチューブは種類によらず、共通するシグナル伝達経路の活性化を引き起こすことが示唆された。一方、Actin Cytoskeleton Signaling、Calcium Signaling、ILK Signaling、GP6 Signaling、PAK Signaling などのパスウェイ活性化されたことは、MWCNT-7 で誘発した中皮腫のみでみられたことから、これらのパスウェイは中皮腫の発生に関与することが考えられた。今後は、肺腺癌および中皮腫の発生にキーとなる遺伝子を探索する予定である。

E. 結論

異なる種類のカーボンナノチューブで誘発したラット肺発がんには共通する発がん機序が存在することが示唆された。一方、MWCNT-7は異なる機序により肺腺癌および中皮腫を誘発することが考えられた。この結果を異なる化学物質の毒性、とくに発癌性への応用について検討を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336, 32-38, 2021.
2. Kakehashi A, Chariyakornkul, A, Suzuki S, Khanphram N, Tatsumi K, Yamano S. Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 13(6), 2021.
3. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 96: 180-187, 2020.
4. Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani. T Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of

cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett*, 479: 89-99, 2020.

5. Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*, 33: 279-285, 2020.
6. Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 21, 2020.
7. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*, 94: 927-937, 2020.

2. 学会発表

1. 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明、第 93 回産業衛生学会、WEB 開催 (2020 年 4 月)
2. 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用、第 47 回日本毒性学会学術年会、WEB 開催 (2020 年 6 月)
3. 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開、第 27 回がん予防学会総会、WEB 開催 (2020 年 9 月)
4. Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice、第 79 回日本癌学会学術総会、WEB 開催 (2020 年 10 月)
5. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出、第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、WEB 開催 (2021 年 1 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし