

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

分担研究課題名：カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーの肺における有害性の比較と有害性指標の検索

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 実験病態病理学 准教授

## 研究要旨

ナノサイズの金属・カーボン・有機物粒子・繊維状物質は非常に安定であり、吸入された場合は組織・細胞に長期間沈着する。従来の化学物質が、物質自体の代謝変換によって障害や発がんを誘発するのは異なり、ナノマテリアルの障害性及び発がん性には、不可逆的な蓄積とそれに対する慢性的な炎症や異物反応が関与する。申請者らはこれまでに、吸入暴露試験で発がん性を認めたMWCNT-7を含めた複数のカーボンナノチューブ（CNT）について、経気管肺内噴霧投与方法（TIPS法）を用いた肺および中皮発がん性の検出に成功した。本研究では、物性の異なるCNTsをモデル物質として、TIPS投与方法によるラット肺・胸膜中皮発がん性の有無、および発がん性の程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより求められたCNTのAdverse Outcome Pathway（AOP）を、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的として行う。本年度は、肺発がん性が検出されたMWCNT-7、NWCNT-Nを陽性対照として、肺発がん性が未知であるフラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）について、TIPS投与方法による肺腫瘍性病変の発生と酸化ストレス蓄積について解析した。

その結果、MWCNT-7、MWCNT-Nでは肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FLおよびFLW投与群では腺癌の発生を認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。肺発がん性を示すMWCNT-7およびMWCNT-N投与群において、投与後104週のみならず、1週においても肺胞上皮細胞核における活性酸素種（ROS）レベルの上昇が見られたことから、酸化ストレスはCNTによるAOPとして重要で、発がん機序に強く関与すること、また発がん性の短期予測指標になりえる可能性が示唆された。

現在、MWCNT-7、MWCNT-Nを含む、壁層数・形状・長さが様々なCNTsについて、TIPS投与方法を開始しており、肺・中皮の毒性変化について、急性・亜急性・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて、経時的なサンプルを回収し次第、病理組織、酸化ストレスなど基本的な毒性の定量とともに、NGSによる遺伝子発現変化や変異シグネチャーの同定を試みる。また *in vitro* 系として、マウス肺オルガノイドの培養条件を検討しており、TIPS試験と同様のCNT暴露による細胞層増殖活性やROSの変化を解析する。

## A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECDでは、CNTを含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今までに1物質（MWCNT-7）が日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法（TIPS法）を用いた試験デザインを開発し、4種のMWCNTについて肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。しかしながら、CNTの発がん性を規定するAdverse Outcome Pathway（AOP）は明らかにされて

いない。本研究では、CNTやCNTと同様に炭素原子から構成され、発がん性が未知であるフラーレン（FL）およびフラーレンウィスカー（FLW）のTIPS投与方法による肺と胸膜中皮に対する障害性および発がん性について定量する。また、CNTの沈着による酸化ストレス誘発と発がん性との相関性を解析することにより、酸化ストレスがCNTのAdverse Outcome Pathway（AOP）に関連するかを検討する。また、CNTの有害性と物性の関連について、発がん期だけでなく、それ以前の亜急性・亜慢性期についても経時的に解析するため、CNTsのTIPS投与方法を開始する。

## B. 研究方法

### (1) TIPS法によるFLおよびFLWの肺発がん性の検証

本年度は、CNTによるAOPを求めるのに最適な解析方法を検討するため、MWCNT-7、MWCNT-N、FLおよびFLWをTIPS投与方法後、発がん期（104週間）に到達したラットの肺発がん性を解析することにより、発がん性が未知であるFLとFLWの発がん性の有無と酸化ストレスや

遺伝子変化を検証する。

FW、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nは、PFポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ合計投与量が0.25あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与（対照）群を設ける。投与後1週と104週間にイソフルラン深麻酔下にて大動脈より採血屠殺（1週は無処置群、対照群およびFL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nの高用量群から各群5匹、104週は各群20匹）して、肺の急性病変と発がんについて解析する。投与後1週では、対照群と比較して、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、肺重量の有意な増加（いずれも $P < 0.001$ ）、CD68陽性マクロファージの増加（FLW： $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N： $P < 0.001$ ）を認めたが、肺胞内の好中球浸潤、炎症性サイトカイン*Ccl2*および*Ccl3*のmRNA発現レベルと活性酸素種（ROS）蓄積量は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群でのみ対照と比較して有意に上昇した（いずれも $P < 0.001$ ）。急性肺毒性の結果から、ナノチューブ投与による酸化ストレスの誘発は、CNTによる肺毒性、発がん性のKey Eventであり、ゲノム変異の原因や早期発がんマーカーとなる可能性がある。そこで104週目では、TIPS投与した被験物質の肺内沈着量の定量、病理組織学的な腫瘍性病変の定量による発がん性の解析とともに、発がん性に対する酸化ストレスおよびゲノム変異の寄与を検証する。肺内被験物質沈着量は、小片に切り刻んだ肺に対して5%硝酸水溶液を20 mL加え、マイクロ波前処理装置（Multiwave G0, Anton Paar）で溶解しHPLC測定する（LC-10、島津製作所）。酸化ストレスは、ROSによるDNA損傷により蓄積される8-OHdGを指標として、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺標本を用いた免疫染色法（Anti-8OHdG mouse monoclonal Antibody, MOG-100P, JaICA、日本）により定量解析をする。

## (2) CNTの物性と発がん性の解析

上記のMWCNT-7、MWCNT-Nを含む、壁層数・形状・長さが様々なCNTsについて、ラットにTIPS投与することにより、肺および中皮の毒性変化について、亜急性・亜慢性・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて詳細に解析する。12週齢F344雄ラットに各種CNTを4週間に合計が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるようにTIPS投与する。また発がんにおける比較対照として、既知の発がん物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を4000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)を200mg/kgとなるようにした群を設ける。群構成はMWCNT-7、MWCNT-N、SWCNT、DHPN、NNK、無処置、溶媒対照とし、以後無処置にて、投与後4週、13週、52週、および104週に屠殺する。屠殺時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取したのち、採血、胸郭を主体とした主要臓器を採取する。亜急性期（4週）では、FFPEの病理組織学的解析により、炎症、組織障害や増殖活性の変化について解析する。HPLCにより被験物質の肺沈着量を測定する。凍結標本により、*Ccl*等の炎症性サイトカインレベルの定量を行う。ROSの

定量は(1)の手法と同様に免疫染色で確認する。亜慢性期以降の解析では、これらの解析に加えて、FFPEあるいは凍結検体由来ゲノムDNAを用いて、NGSによる全ゲノム解析を行う予定である。

## (3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

### 1. Mφ細胞における毒性解析

マウスMφ細胞（RAW264.7）に、(2)で用いたCNTを投与する（0.5mg/ml、*in vivo* 0.5mg/ラット相当）。マウスMφから産生される炎症性サイトカイン（ELISA、定量的RT-PCR）やROS（DCF-DAアッセイ）を定量する。

### 2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

本研究で用いる肺オルガノイドは、C57BL/6Jマウス肺から採取する。単層の嚢胞状を呈し幹細胞のほか線毛をもつような分化した細胞から構成される。本年度は、まず肺オルガノイドの至適培養条件を検討する。

#### （倫理面の配慮）

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換

え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており（H28M-45、医動20-028）、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

## C. 研究結果

### (1) 肺発がん性に対するFLおよびFLWの影響

#### (1)-1. 肺腫瘍性病変の定量解析

TIPS投与中の動物死亡により、発がん性の評価は、無処置群（20匹）、対照群（17匹）、FL0.25(mg、以下省略)群（20匹）、FL0.5群（19匹）、FLW0.25群（20匹）、FLW0.5群（18匹）、MWCNT-70.25群（20匹）、MWCNT-70.5群（20匹）、MWCNT-N0.25群（20匹）、MWCNT-N0.5群（20匹）で行った。104週間の観察期間途中で死亡動物が発生したため、最終的に104週では、無処置群（12匹）、対照群（13匹）、FL0.25群（14匹）、FL0.5群（12匹）、FLW0.25群（15匹）、FLW0.5群（13匹）、MWCNT-70.25群（15匹）、MWCNT-70.5群（15匹）、MWCNT-N0.25群（17匹）、MWCNT-N0.5群（12匹）を剖検した。途中死亡例では、自然発生の白血病、皮下腫瘍や甲状腺腫瘍などが死因であった。組織学的には、無処置群、対照群、FL0.5群、FLW0.25群、FLW0.5群とMWCNT-70.25群では明らかな肺病変の発生を認めなかったが、FL0.25群（1/7匹）に肺胞上皮過形成、MWCNT-70.5群（1/5匹）、MWCNT-70.25群（1/3匹）とMWCNT-N0.5群（2/8匹）に肺胞上皮腺癌を認めた。

104 週における剖検例では、体重、臓器重量（肺、肝、腎、脾、脳）を測定し、MWCNT-N0.25 群の全体肺重量、相対肺重量（ $1.74 \pm 0.39\text{g}$ ,  $P < 0.05$ ,  $0.40 \pm 0.08\%$ ,  $P < 0.05$ ）が、対照群（ $1.35 \pm 0.38\text{g}$ ,  $0.31 \pm 0.08\%$ ）と比較して有意に高値であった。その他には有意な変化は認めなかった。肺を組織学的に解析し、途中死亡例と合わせて解析した結果、肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群（0/20 匹）、対照群（1/17 匹）、FL0.25 群（2/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（0/20 匹）、FLW0.5 群（1/18 匹）、MWCNT-70.25 群（4/20 匹）、MWCNT-70.5 群（7/20 匹,  $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.25 群（5/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹）であり MWCNT-70.5 群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。増殖性病変では、肺胞上皮腺腫の発生頻度は、無処置群（1/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（1/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（1/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（2/20 匹）、MWCNT-70.5 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.25 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（0/20 匹）で群間の有意差はなく、肺胞上皮腺癌の発生頻度は、無処置群（0/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（0/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（0/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（2/20 匹）、MWCNT-70.5 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.25 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹,  $P < 0.05$ ）、であり MWCNT-N0.5 群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。肺胞上皮腺腫と腺癌を合わせた肺腫瘍発生頻度では、無処置群（1/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（1/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（1/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（4/20 匹,  $P < 0.05$ ）、MWCNT-70.5 群（4/20 匹,  $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.25 群（4/20 匹,  $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹,  $P < 0.05$ ）で、MWCNT-7 と MWCNT-N ではいずれの用量においても対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。

#### (1)-2. 肺内被験物質沈着量の定量

TIPS 投与後 104 週後の肺における被験物質の沈着量について、各群 3 匹を用いて解析した。その結果、FL0.25 群（ $0.24 \pm 0.13\mu\text{g}$ 、残存率 0.1%）、FL0.5 群（ $0.30 \pm 0.33\mu\text{g}$ 、残存率 0.1%）、FLW0.25 群（ $3.52 \pm 1.05\mu\text{g}$ 、残存率 1.4%）、FLW0.5 群（ $8.30 \pm 8.03\mu\text{g}$ 、残存率 1.7%）、MWCNT-70.25 群（ $62.0 \pm 8.2\mu\text{g}$ 、残存率 24.8%）、MWCNT-70.5 群（ $89.8 \pm 13.5\mu\text{g}$ 、残存率 18.0%）、MWCNT-N0.25 群（ $142.5 \pm 19.6\mu\text{g}$ 、残存率 57.0%）、MWCNT-N0.5 群（ $194.2 \pm 29.0\mu\text{g}$ 、残存率 38.8%）であった。

#### (1)-3. 肺酸化ストレスの定量

酸化ストレスの指標として、8-OHdG を解析した。FPPE 検体を用いた免疫染色では、無処置群と比較して対照群で明らかな変化は認めなかった。被験物質投与群では、FL および FLW 投与群では、いずれの用量においても対照群と比較して明らかな肺胞上皮における陽性細胞の増加は見られなかったのに対し、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、いずれの用量でも有意な核陽性細胞数の増加を認めた（図 1）。

#### (2) CNT の物性と発がん性の解析

TIPS 投与する CNTs について、キャラクターゼーションを行った。線維径は、MWCNT-7 は 100nm、MWCNT-N は 60nm であり、MWCNT-7 の方がより線維径が太いことが確認された。SWCNT の線維径は約 3nm で、SEM 観察では束状になっていた（図 2）。吸光度分析では、SWCNT

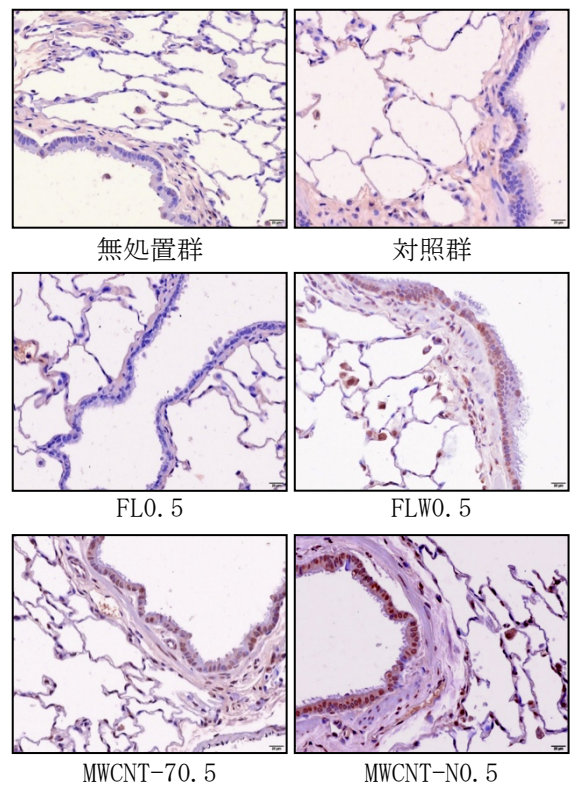


図 1. 8-OHdG 免疫染色（ラット肺、104 週）

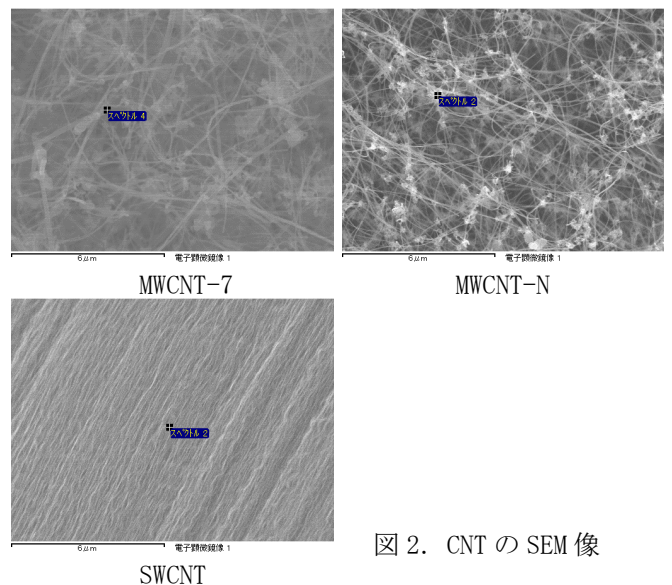


図 2. CNT の SEM 像

が高値を示し、次いで MWCNT-N、MWCNT-7 の順に低下した。各 CNT の層数は MWCNT-7 で約 40 層、MWCNT-N で約 30 層、SWCNT は単層であり、層の少ない順に表面積が大きくなり、吸光度が全体的に高くなったと考えられた。

本年度は、本学医学研究科実験動物研究教育センター

に動物実験計画を申請し承認を得た上、実験に必要な動物および動物施設スペースを確保した。また CNTs と既知発がん物質としての DHPN、NNK については TIPS 投与を開始し、順調に進行中である。現在、投与後 4 週のサンプル採取が完了し、研究サンプルの解析を施行している。

### (3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

現在、マウスMφ細胞 (RAW264. 7) の培養液中にCNTs を添加し、培養液中のROSレベルおよびMφ細胞の炎症性サイトカインmRNA発現レベルを解析している。CNT による酸化ストレス誘導の結果から、CNTの物性との関連を検証する予定である。

また使用する肺オルガノイドは、マウス正常肺組織に由来するもので、現在オルガノイドの培地、播種数、培養日数などの培養条件を検討している。CNTの肺毒性を解析するためには、CNTを暴露されたMφ細胞による肺オルガノイドへの作用が重要である。しかしながら、肺オルガノイドはマトリゲル中で3次元培養するため、直接Mφ細胞と共培養するには工夫が必要である。そこで、今年度はまずCNTを暴露し酸化ストレス誘導の程度が明らかになったMφ培養上清を、肺オルガノイドに投与して解析を進める予定である。肺オルガノイドを用いたNGS解析により、単独の遺伝子変動ではない、全体の遺伝子発現均衡の変動によって変化する生物学的・機能的パスウェイの抽出(遺伝子オントロジー解析)を試み、CNTの毒性として意義のある生体反応や機能を検出する。

## D. 考察

肺発がん性が未知のナノマテリアルであるFLとFLWについて、肺発がん性を示すMWCNT-7やMWCNT-Nを陽性コントロールに設定し、TIPS投与104週(2年)後の肺を解析した。その結果、FLとFLWはMWCNT-7やMWCNT-Nと異なり、肺に対する発がん性を示さないことが明らかになった。短期試験(1週)では、MWCNT-7、MWCNT-NだけでなくFLWにおいても、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺泡マクロファージの増加を認めた。その一方、肺におけるROS蓄積や*Cc12*、*Cc13*mRNA発現上昇は、FLやFLでは見られず、MWCNT-7、MWCNT-Nでのみ認めた。肺におけるROSによるDNA損傷は、104週において、肺腺癌が誘発されたMWCNT-7と-Nで有意に高く、CNTによる酸化ストレスとDNA障害が、肺発がんを誘導する可能性が強く示唆された。TIPS投与104週後の肺内被験物質の蓄積量は、MWCNT-7やMWCNT-Nと比較すると、FLWおよびFLWにおいて極めて少なく、MWCNTsと比較してFLとFLWは排出されやすいと考えられる。このようなCNTsの排泄の差異が酸化ストレスの誘発や発がん性の有無に関与する可能性も考察する必要があると考えられる。

TIPS法は、大規模な吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺、中皮毒性の評価が可能である。これまでのTIPS法による研究の蓄積から、複数のMWCNTsの発がん性が明らかになってきたことを踏まえ、本研究ではまず、TIPS法による研究サンプルを用いて、酸化ストレスやゲノム変化を多段階に解析することに

より、CNTのAOPを導き出すことを目指している。とくに亜急性期のサンプルや非腫瘍性のサンプルからも検出されるAOPを得られた場合、*in vitro*系においても毒性指標となりうることから、より短時間で簡便な評価手法に応用できる可能性がある。*In vitro*試験法として、3次元構造のほうが従来の2次元培養よりもより生体に近いと考え、肺オルガノイド培養系を確立していく。ROS、サイトカイン発現およびNGSによるゲノム変化など、*in vivo*解析で見られている毒性指標を解析することで、*in vitro*で連動するものを見出す。

## E. 結論

TIPS法を用いて、FLおよびFLWのF344ラット肺発がん性についてMWCNT-7、MWCNT-Nを陽性対照として検討した。陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nでは肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FLおよびFLW投与群においては、腺癌の発生は認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。投与後104週のラット肺において、MWCNT-7 およびMWCNT-N投与群では、気管支および肺胞上皮細胞の核DNA 8-OHdG形成レベルが上昇し、肺発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化ストレスや8-OHdG形成の誘導が関与していると考えられる。投与後1週間の肺においてもROSレベルの上昇は、MWCNT-7とMWCNT-Nのみに認め、発がん性を示さなかったFLとFLWでは見られなかったことから、ROSはCNT発がんの短期予測指標になりえる可能性があると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 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. ○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.
3. ○Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, [Naiki-Ito A](#), Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, [Tsuda H](#). Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 17:48, 2020.
4. Tomita N, Hotta Y, [Naiki-Ito A](#), Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease. *Physiol Rep.* 8:e14556, 2020.
5. ○[Naiki-Ito A](#), Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama

- Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
6. Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, **Naiki-Ito A**, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *Neurourol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
  7. Nozaki S, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
  8. Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, **Naiki-Ito A**, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 25:2737, 2020.
  9. ○**Naiki-Ito A**, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 41:1145-1157, 2020.
  10. ○Yeewa R, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 12: pii: E558, 2020.
  11. ○Iida K, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Cancer Sci.* 111:1165-1179, 2020.

## 2. 学会発表

1. **内木綾**、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智. MiR-8080はandrogen receptorスプライスバリエーションの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第109回日本病理学会 (2020年7月、Web開催)
2. **Aya Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第79回日本癌学会学術総会 (2020年10月、広島)
3. **内木綾**. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み (A演説)、第66回日本病理学会秋期特別総会 (2020年11月、浜松)

## H. 知的所有権の取得状況

### 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。