

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による肺内酸化ストレス解析

研究分担者 梯アンナ 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 講師

研究要旨

本研究ではナノマテリアルの肺発がん性メカニズムについて検討し、肺発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的としている。F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与した。ラット肺における免疫染色及び ELISA 法を用いて 8-OHdG の形成レベルを解析した。免疫染色を用いた解析では MWCNT-7 及び MWCNT-N 投与したラット肺の過形成、気管支および肺胞上皮細胞において核 DNA の酸化的損傷マーカー、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルの有意な上昇が認められた。また、FLW 投与群では 8-OHdG 形成レベルの誘導が気管支上皮細胞のみで見られ、上昇傾向が観察された。肺の凍結サンプルを用いた ELISA 法解析では 8-OHdG 形成レベルは MWCNT-N の高用量群でのみ、有意に誘導されていた。本研究では F344 ラット肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い増加が認められ、その二つの CNT において発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや 8-OHdG 形成の誘導が関与していると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアルにはリスクと利益が存在し、そのリスクの程度を知ることが重要である。そのためには、毒性を検出する必要があり、吸入暴露試験の代替法は、検査に役立つと思われる。将来、ナノマテリアルの発がん性、特に CNT の発がん性が証明される場合、リスク評価の研究が必要となる。本実験では F344 ラットを用いて *in vivo* 系の実験ではナノマテリアルの発がん性メカニズムについて検討し、肺において発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与した。形成レベルの変化を調べた。

1. ラット肺からの DNA の抽出

ラット左肺サンプル (300 mg) からの DNA の抽出は、以前に報告されている方法を少し改良して行なった¹⁾。簡略に記載すると、核の DNA は、細胞内小器官を溶かすために抗酸化剤 NaI 液を含む DNA Extractor WB kit (和光純薬工業株) を用いて抽出した。更に、細胞溶解の段階における自己酸化を防止するため、deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を細胞溶解剤に添加した。DNA は、nuclease P1 (ヤマサ醤油株、千葉) とアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) によりデオキシヌクレオチドに断片化し、8-OHdG 形成レベルは ELISA 法により測定した。

2. 8-OHdG 形成の測定 (ELISA 法)

左肺から抽出した DNA サンプルにおける高感度 8-OHdG Check ELISA キット (日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所、静岡、日本) を用いてメーカーの説明に従って 8-OHdG 形成レベルを測定した。

3. 免疫組織化学的 8-OHdG 検査

右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色ABC法を用いて8-OHdGの形成レベルを解析した。8-OHdGの免疫染色方法が以前報告されている。肺のパラフィンブロックを3 μ mに薄切した。切片は内因性ペルオキシダーゼをブロックするため0.3%水素水で処理した。馬血清で背景染色をブロッキング処理後、切片は抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体(1:100、日本老化制御研究所製、静岡、日本)をかけて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。

4. 統計処理—試験実施施設

対照群と各投与群との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% ($P < 0.05$) 又は 1% ($P < 0.01$) のレベルで判定した。統計学的解析は、8-OHdG 形成レベル平均値の差について、5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Bartlett' s 法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. ラット肺における8-OHdG形成 (ELISA法で測定)

DNA中における8-OHdG形成の分析結果を図1に示した。ラット肺より抽出したDNAにおける8-OHdGは、0.5 mg/rat MWCNT-N群においてのみ、対照群値と比較して統計学的に有意な増加がみられた。他のナノマテリアルの投与群では8-OHdG形成の上昇が見られなかった。

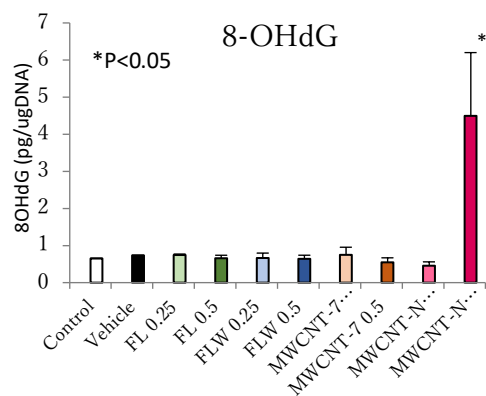


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (ELISA法)

2. ラット肺における8-OHdG形成 (免疫染色で測定)

免疫染色を用いた解析結果は図2と図3に示した。

免疫染色解析では0.25及び0.5 mg/rat MWCNT-7及びMWCNT-Nを投与したラットの肺では8-OHdG形成レベルの有意な上昇が確認された(図2, 3)。MWCNT-7及びMWCNT-N 低用量及び高用量投与群のラット肺過形成、気管支及び肺胞上皮細胞において8-OHdG陽性な細胞が多く見られた。

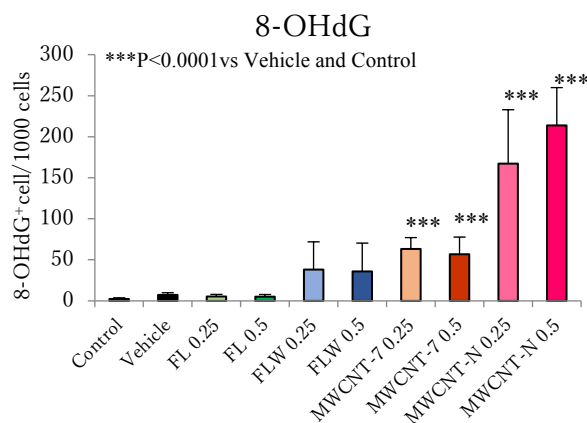


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

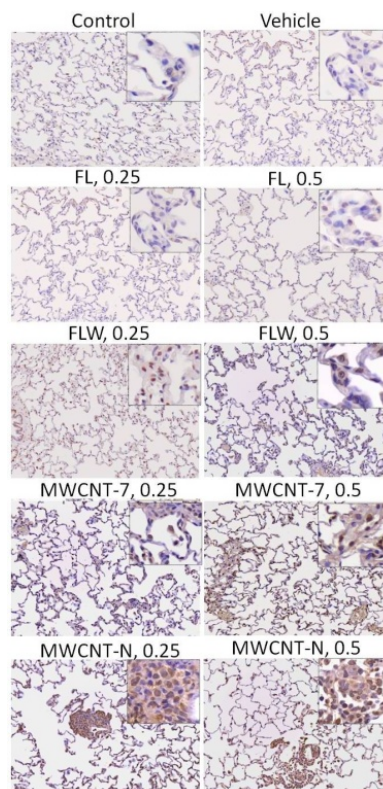


図3. 8-OHdG免疫染色の代表的な写真

FL 0.25及び0.5 mg/rat投与群では8-OHdG形成レベルは対照群値と同等であった。FLW 0.25及び0.5 mg/rat投与群では8-OHdG形成レベルの増加傾向が見られた(図2, 3)。

D. 考察

DNAとROS(活性酸素)の反応により形成される付加体である8-OHdGは、酸化的DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。

本試験において、0.25 および 0.5mg/ml MWCNT-7 又は MWCNT-N を 104 週間投与後、肺腺がんの有意な発生が認められており、肺胞、気管支上皮および肺過形成細胞のDNA中における8-OHdG蓄積に関連していると考えられる。更に、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷は、マクロファージの増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。

E. 結論

F344 ラットの肺において 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形成レベルの強い上昇が認められた。その二つのCNTにおいて発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや8-OHdG形成の誘導が関与していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kakehashi A**, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers*, 13,1216, 2021.
- 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.* 21:7746, 2020.

3. Sakai A, Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment, *PLoS One*. 15:e0238120, 2020.
4. ○Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, **Naiki-Ito A**, **Kakehashi A**, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33:279-285, 2020.
5. ○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. **梯アンナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第37回日本毒理学病理学会総会及び学術集会(2021年1月29日)
2. 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割. 第79回日本癌学会学術総会(2020年10月3日)
3. 魏民、鈴木周五、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物の経胎盤ばく露によるマウス肺発がんにおけるヒストン H3K9 メチル化異常の関与. 第79回日本癌学会学術総会(2020年10月1日)
4. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシ

ン酸(DMA)はマウス経胎盤ばく露によりヒストンH3K9修飾を介した肺発がんを促進する。2020年度文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成

【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会(2020年9月11日)

5. 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(2020年6月29日)

6. 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回日本産業衛生学会(2020年6月12日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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。