

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和3年度 分担研究報告書

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の肺・胸膜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とは異なり、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 MVCNT-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、TIPS 投与による多層 CNT（MWCNT-7, MWCNT-N）と肺発がん性未知の単層 CNT（SWCNT）による *in vivo* 肺、胸膜有害性・発がん性試験を開始し、経時的に、病理組織、酸化ストレスなど基本的な毒性について定量解析することとした。

これまでに、亜急性（4 週）および亜慢性（13 週）毒性についてサンプルを回収し解析した。その結果、MWCNT-7, MWCNT-N 投与により、肺胞上皮の 8-OHdG 形成レベルと DNA 損傷マーカー陽性率が有意に上昇し、肺胞上皮および胸膜中皮の増殖活性が増加したのに対し、SWCNT による有意な変化は見られなかった。またケモカイン（Cc12, Cc13, Cc19）の肺 mRNA 発現は、それらの因子と相関して変動した。*In vitro* においても、MWCNTs はマクロファージによる活性酸素種の産生を誘導するのに対し、SWCNT では誘導されなかった。以上より、酸化的 DNA 損傷と細胞増殖活性化は 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、*in vivo* 試験は順調に経過中で、慢性期（52 週）の剖検まで完了した。亜急性、亜慢性期の肺サンプルを用いて RNA シーケンシング解析中で、多数のケモカイン、サイトカインとともに、細胞周期、免疫応答遺伝子の発現上昇を認め、さらなる有害性指標となりえる遺伝子候補として追求していく。*In vitro* 試験では、*in vivo* 試験で有用であった指標について、肺オルガノイドの培養条件を検討し、CNT 暴露による毒性変化を解析している。

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（多層 CNT, 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、多層 CNTs（MWCNT-7, MWCNT-N）と単層 CNT（SWCNT）の TIPS 投与による肺と胸膜中皮に対する障害性及び発がん性について、酸化的 DNA 障害、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析し、CNT の物性（層数、形状や鉄含有量）と照合することにより、発がんに寄与する責任因子を推定することが可能であると考える。また、同定した遺伝子変化の情報をを用いて、CNT の AOP を構築し、有害性評価指標として応用可能で信頼の高いものを選出することを目標とする。また、TIPS 投与後、発がん期に至る以前の亜急性・亜慢性期の非腫瘍部や *in vitro* 投与においても検出することが可能な AOP は、*in vitro* 試験法を含む短期・簡便な試験法における評価指標に利用できる可能性を含み、それらに言及する成果体を得ることも目指す。

B. 研究方法

(1) *In vivo* 実験：TIPS 投与による CNT 負荷試験と有害性の解析

MWCNT-7, MWCNT-N と SWCNT 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0.1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。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量のみで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する（1物質77匹：4週（10匹）、13週（7匹）、52週（10匹×2）、104週（20匹×2）。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質（総タンパク、アルブミン）解析に供する。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺して、肺の急性病変と発がんについて解析する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、マクロファージ（Mφ）局在（抗CD68抗体、BIO-RAD）、増殖活性（抗Ki67抗体、Abcam）、アポトーシス（TUNEL、タカラバイオ）やDNA損傷（抗γH2AX抗体、CST）の程度について免疫組織学的に解析する（内木）。右肺の一部から1-2mm角の組織片を切り出し、2%グルタルアルデヒドで固定し、透過電子顕微鏡（TEM）によるCNT観察に用いる。左肺は凍結し、RNA抽出（ISOGEN、ニッポンジーン）と定量的RT-PCRによりCCL種、IL種等の炎症性サイトカイン発現を定量する。さらにNGSを用いたRNAシーケンシング解析（マクロジェン）に用いる。

(2) *In vitro*実験：Mφ細胞と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、(1)で用いたCNTsを投与し（25-100 μg/ml）、48時間培養する。マウスMφ細胞の細胞生存率（WST-1、ロッシュ）、産生される炎症性サイトカイン（定量的RT-PCR）やROS（DCF-DAアッセイ、サーモフィッシュャーサイエンティフィック）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。このオルガノイド培養は、マトリゲル（Corning）コート上に、増殖因子含有培地下に播種し、さらにマトリゲルを重層化することにより行う。この方法は、肺オルガノイドに対する被験物質の投与に制限をきたす可能性があるため、肺オルガノイドの至適培養条件を検討する（内木）。(2)-1のCNT処理マウスMφ細胞培養上清を、肺オルガノイドに48時間暴露する。細胞生存率や炎症性サイトカインのmRNA発現解析を行う（内木）。

（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、名古屋市立大学内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（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) *In vivo* 実験：CNTによる肺・中皮有害性の解析

(1)-1. CNTによる臓器重量の変化

4週の剖検時、体重および肝、腎、心、脾の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置（No treatment）群（絶対重量 1.1 ± 0.1 g）と比較して、対照（vehicle）群（ 1.3 ± 0.1 g、 $P < 0.05$ ）で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、MWCNT-7群（ 1.5 ± 0.1 g）、MWCNT-N群（ 1.8 ± 0.2 g、 $P < 0.001$ ）、SWCNT群（ 2.0 ± 0.2 g、 $P < 0.001$ ）で増加傾向を認め、MWCNT-NとSWCNTで有意に増加した。この傾向は、13週でも同様であった。無処置群（ 1.1 ± 0.1 g）、対照群（ 1.3 ± 0.0 g、 $P < 0.05$ ）、MWCNT-7群（ 1.4 ± 0.1 g）、MWCNT-N群（ 1.8 ± 0.0 g、 $P < 0.001$ ）、SWCNT群（ 2.1 ± 0.1 g、 $P < 0.001$ ）。

(1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞Mφ誘導と沈着

4週、13週、いずれにおいても、CD68免疫染色により、CNT投与群では対照群と比較して肺胞Mφが有意に誘導された（MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTいずれも $P < 0.001$ ）。偏光顕微鏡により肺胞Mφに貪食される形でMWCNT-7、MWCNT-NとSWCNTを認めた。SWCNT投与群では好中球浸潤を高度に伴っていた。電子顕微鏡（TEM）観察において、CNTsの線維径は、MWCNT-7（ 76.3 ± 25.2 nm）、MWCNT-N（ 46.6 ± 11.7 nm）であり、SWCNTは検出不可であった（図1、参考資料では3nm）。

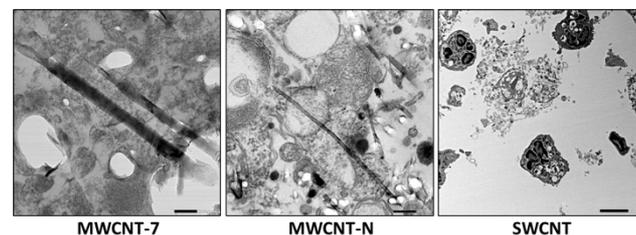


図1. 肺胞MφによるCNTの貪食（TEM像）。

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析

4週、13週、いずれにおいても、増殖活性、酸化ストレス、DNA障害やアポトーシスについて、免疫染色による定量解析を行った。その結果、肺胞上皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、増殖活性の亢進が見られた一方、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった（図2）。MWCNT-7、MWCNT-N投与により、8-OHdG陽性細胞数が有意に増加した。SWCNT投与群において、8-OHdG陽性細胞を検出したが、無処置群、対処群に対して有意な増加は認められなかった（梯の稿）。γH2AX標識率は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で高い傾向があり、4週ではいずれにおいても、13週ではMWCNT-Nに有意な上昇を見た（図3）。TUNEL染色では、4週においてMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に陽性率が高く、SWCNTに変化は見られなかった。13週ではCNT投与群で高い傾向があったが、個体差が大きく有意差は認めなかった（図4）。

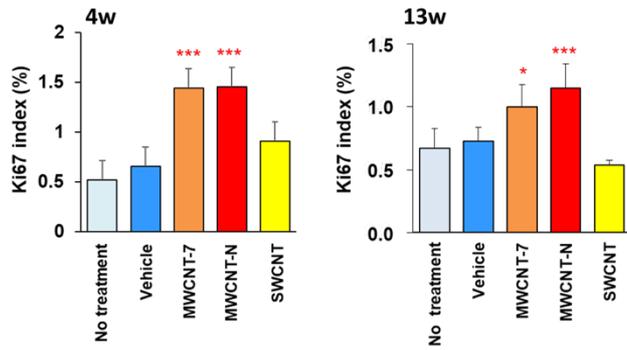


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、*P < 0.05、***P < 0.001 vs Vehicle。

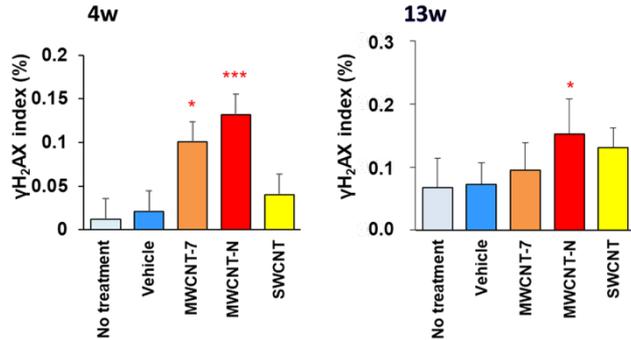


図3. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05、***P < 0.001 vs Vehicle。

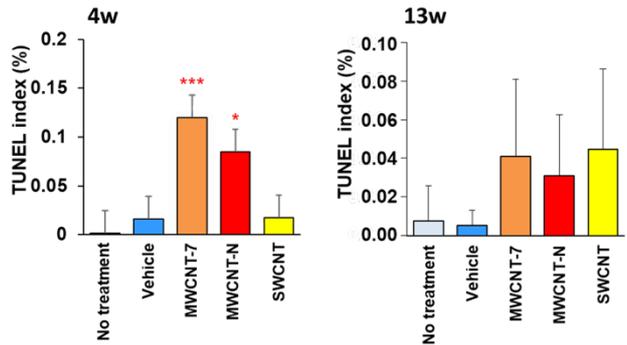


図4. CNT投与による肺胞上皮アポトーシスの変化 (TUNEL染色)、*P < 0.05、***P < 0.001 vs Vehicle。

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

4週に採取した胸腔洗浄液や心組織を用いて、胸膜中皮細胞の有害性を解析した。胸腔洗浄液における総タンパクおよびアルブミン値について、無処置群 (それぞれ $25.9 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$ 、 $73.0 \pm 6.3 \mu\text{g/ml}$)、対照群 ($23.8 \pm 5.2 \text{ mg/dl}$ 、 $66.5 \pm 12.1 \mu\text{g/ml}$) と比較して、MWCNT-N ($39.9 \pm 9.6 \text{ mg/dl}$ 、 $P < 0.05$ 、 $96.0 \pm 19.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $P < 0.05$) で有意に増加した。MWCNT-7 ($34.6 \pm 8.7 \text{ mg/dl}$ 、 $86.0 \pm 19.0 \mu\text{g/ml}$) と SWCNT ($28.6 \pm 4.5 \text{ mg/dl}$ 、 $76.5 \pm 10.6 \mu\text{g/ml}$) では有意な変化は見られなかった。胸腔洗浄液中の Mφ 量は、群間で有意差を認めなかった。心膜中皮細胞における Ki67 標識率は、対照群と比較して MWCNT-7、MWCNT-N 投与群で有意に上昇し、SWCNT では明らかな変化は見られなかった (図 5A)。γH2AX 標識率には有意な変化を認めなかった。(図 5B)。

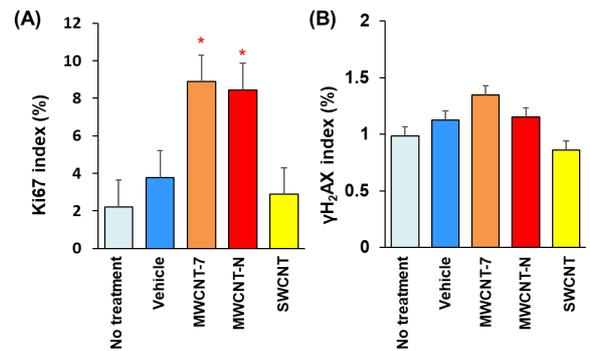


図5. CNT投与による心膜中皮細胞の(A)増殖活性 (Ki67免疫染色)と(B) DNA障害 (γH2AX免疫染色)の変化、4週、*P < 0.05 vs Vehicle。

(1)-5. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

肺におけるケモカインmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。4週では、Ccl2、Ccl3発現は、CNTs投与群でいずれにおいても有意に上昇した。Ccl9発現は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に高く、SWCNTでは明らかな変化を認めなかった。Tnf-α、Il-1βやTgf-βでは、CNT投与に特異的な発現変動を示さなかったが、Tnf-αおよびIl-1β発現は、CNTs投与により軽度上昇する傾向があり、MWCNT-NとSWCNTで有意差を認めた (図6)。13週も4週とほぼ同様の結果を認めた。

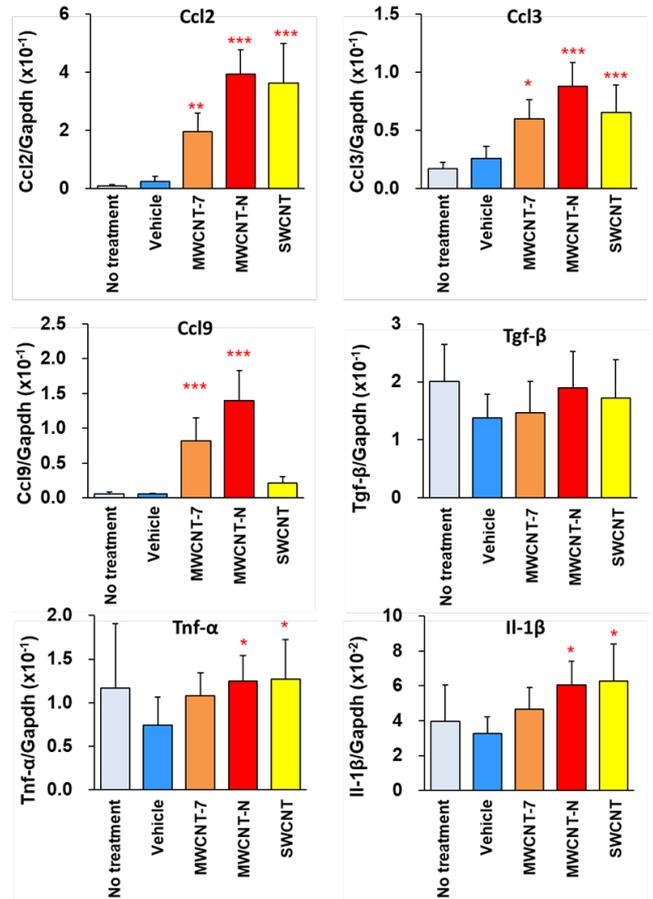


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle。

(3) *In vitro*実験: Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

マウスMφ細胞 (RAW264.7) にCNTsを投与し、細胞生存率と活性酸素種 (ROS) の産生量を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下し、MWCNT-7とMWCNT-Nではその程度が顕著であった (図7)。Mφ細胞中のROS産生は、MWCNT-7およびMWCNT-Nにより有意に増加し、特にMWCNT-7で高値を示した (図8)。一方で、SWCNTでは投与による変化は全く見られなかった。*In vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認め、*Ccl2*のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。*In vitro*においても、CNTs投与によりいずれも有意な発現上昇を認め、*in vivo*と類似したパターンを示した (図9)。

次に、肺オルガノイドの培養条件を検討するために、以下の条件で培養を行った。①従来法: コーティングしたマトリゲル上にオルガノイドを播種し、さらにマトリゲルを重層化して培養する、②3次元回転培養法: 3次元回転培養装置を用いて、5%マトリゲル含有培養液中中で培養する、③超低接着培養法: 超低結合の表面処理をされたフラスコあるいはプレートにより、5%マトリゲル含有培養液中中で培養する。その結果、①従来法と比較して、②③はオルガノイドの生育状態が良好で、培養方法はより簡便であった。また①と比較して②③は高価なマトリゲル使用量が少なく、安価に暴露試験が実施できることがわかった。今年度は③の手法で、CNTを暴露しROS産生の程度が明らかになったMφ培養上清を、オルガノイドに投与した。すでにオルガノイドRNAは抽出済みで、現在定量RT-PCRによりmRNA発現解析を進めている。

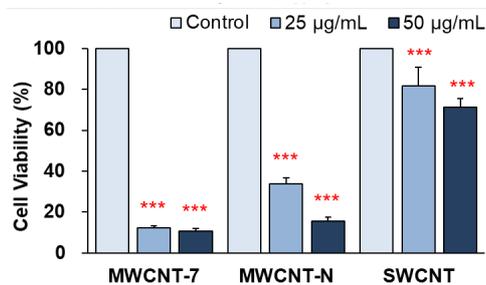


図7. CNT投与によるマウスMφ細胞RAW264.7の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control。

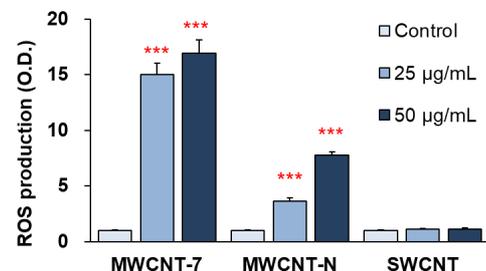


図8. CNT投与によるマウスMφ細胞RAW264.7のROS産生量の変化 (DCF-DAアッセイ)、***P < 0.001 vs Control。

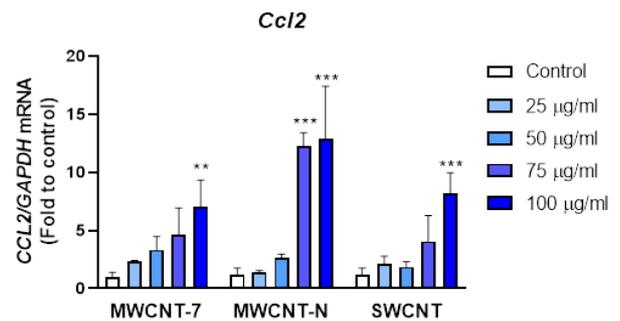


図9. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) のCcl2発現の変化 (DCF-DAアッセイ)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control。

D. 考察

今年度は、CNTの物性 (層数、鉄含有量、形状) の差異と肺、中皮に対する有害性の関連を明らかにするために、発がん性が未知のSWCNTと、陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nを同条件でTIPS投与し比較検討した。安定した投与、解析手法により経時的に観察することより、CNTの有害性を正確に捉えることが可能となる。特に健康影響評価法として、有害性指標を活用する際に、手法の固定化は必須と考えられる。それらにより、CNTのAOPや発がん性に特異的で、有害性の評価指標として有用な遺伝子変化および遺伝子変異を抽出することを試みた。現在、亜急性期 (4週) と亜慢性期 (13週) まで解析が進み、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7投与による、肺胞上皮および中皮におけるDNA損傷の増加と、それと関連した細胞増殖活性の亢進が検出された。いずれの期間においても、肺と中皮に増殖性病変は形成されておらず、DNA損傷マーカー (γH2AX) と増殖活性マーカー (Ki67) は、腫瘍発生前の短期試験によるCNTの有害性指標として有用であると考えられる。これまでの結果から、MWCNTs投与後1週間の時点で、肺胞内のROS産生が確認されており、DNA損傷や細胞増殖の変化との関連が示唆された。

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。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は、*in vitro*においても毒性指標となりうる。今年度の解析から、酸化的DNA損傷マーカー (8-OHdG)、DNA損傷マーカー (γH2AX) や、増殖活性マーカー (Ki67) とともに、Ccl種の発現が有望な指標である可能性が示唆された。また現在解析を行っている肺のRNAシーケンシングでは、今回検討したCcl種以外の多数のケモカインやサイトカインとともに、細胞周期、免疫応答遺伝子の発現上昇を認めることが明らかになり、AOPの妥当性について検討していく。

Mφに対するCNT投与 *in vitro* 解析では、酸化的ストレスやCcl種等、*in vivo* 試験と同様に変動する指標が得られており、生体の肺胞Mφと類似した環境を現わしているものと考えられる。本年度は、肺オルガノイド培養条件を検討し、マトリゲル重層下で培養する従来法と比較して、マトリゲル含有培地内で培養する手法の方が、CNT投与、共培養やオルガノイドからのRNA、タンパク抽出に適していることが示唆された。肺オル

ガノイド培養系においても、酸化的ストレス、サイトカイン発現やNGSによるゲノム変化を解析し、さらに *in vivo* と連動する指標を蓄積させる。

E. 結論

今年度は、MWCNT-7、MWCNT-Nと肺発がん性が未知のSWCNTをTIPS投与し、亜急性（4週）および亜慢性毒性（13週）まで解析した。その結果、MWCNT-7 及びMWCNT-N投与群では、104週と同様に、肺胞上皮のDNA損傷が促進され、ケモカイン、サイトカイン発現量や、増殖活性も相関して増加した。以上より、CNTの発がん機序に酸化的DNA損傷による細胞増殖の活性化が関与していると考えられる。一方でSWCNT投与群ではそれらの変化はないか非常に少なかったことから、SWCNTによる有害性はないか少ないことが予測され、今後の解析が待たれる。*In vitro*試験では、*in vivo*試験で有用であった指標について、CNT暴露による毒性変化を解析している。Mφでは、酸化的ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo*試験と同様にCNTにより変動する指標が得られており、引き続き肺オルガノイドを用いて同様の解析をする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyama Y, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 14: 42, 2022.
2. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Nagai T, Etani T, Nozaki S, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Tomiyama N, Banno R, Kubota H, Hamamoto S, Ando R, Kawai N, Yasui T. Chronological transition in outcome of second-line treatment in patients with metastatic urothelial cancer after pembrolizumab approval: a multicenter retrospective analysis. *Int J Clin Oncol*. 27:165-174, 2021.
3. Nakagawa M, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Ozawa Y, Shimohira M, Ohnishi M, Shibamoto Y. Usefulness of advanced monoenergetic reconstruction technique in dual-energy computed tomography for detecting bladder cancer. *Jpn J Radiol*. 40:177-183, 2021.
4. Kachi K, Kato H, **Naiki-Ito A**, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S. Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation. *Int J Mol Sci*. 22:7444, 2021.
5. Subhawa S, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S. Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 13:3403, 2021.
6. Matsui T, Hamada-Tsutsumi S, Naito Y, Nojima M, Iio E, Tamori A, Kubo S, Ide T, Kondo Y, Eguchi Y, Komori A, Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T,

Shirabe K, Kimura K, Hiasa Y, Chuaypen N, Tangkijvanich P, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Ochiya T, Tanaka Y. Identification of microRNA-96-5p as a postoperative, prognostic microRNA predictor in nonviral hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 52:93-104, 2021.

7. Isobe T, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, Kato H, Kawai N, Yasui T. Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review. *IJU Case Rep*. 4:188-191, 2021.
8. **Naiki-Ito A**. [The roles of gap junctional intercellular communication in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and liver fibrosis]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 156:152-156, 2021.
9. Tasaki Y, Suzuki M, Katsushima K, Shinjo K, Iijima K, Murofushi Y, **Naiki-Ito A**, Hayashi K, Qiu C, Takahashi A, Tanaka Y, Kawaguchi T, Sugawara M, Kataoka T, Naito M, Miyata K, Kataoka K, Noda T, Gao W, Kataoka H, Takahashi S, Kimura K, Kondo Y. Cancer-Specific Targeting of Taurine-Upregulated Gene 1 Enhances the Effects of Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 81:1654-1666, 2021.
10. Kato H, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 42:940-950, 2021.
11. Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, **Naiki-Ito A**, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch*. 479:277-284, 2021.
12. 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. 学会発表

1. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝線維化に対する紫米抽出物の抑制効果、第110回日本病理学会（2021年4月、東京都新宿区／ハイブリッド開催）
2. 加藤寛之、**内木綾**. STAT3-DPYD 経路を介した Luteolin の膵癌化学予防効果の検討. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会（2021年6月、Web開催）
3. **Aya Naiki-Ito**, Ranchana Yeewa, Hiroyuki Kato, Teera Chewonarin, Satoru Takahashi. Chemopreventive effect of purple rice extract on rat non-alcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis, 第80回日本癌学会学術総会（2021年10月、横浜／ハイブリッド開催）

4. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、高橋智. ラット非アルコール性脂肪肝炎に対する紫米抽出物の化学予防効果、第38回日本毒性病理学会（2022年1月、神戸／ハイブリッド開催）
5. Sheema Asraful Nahar, **Aya Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, Masayuki Komura, Hiroyuki Tsuda, Satoru Takahashi. Evaluation of lung and mesothelial carcinogenicity of single-walled carbon nanotube compared with MWCNT-7 and MWCNT-N、第38回日本毒性病理学会（2022年1月、神戸／ハイブリッド開催）
6. **内木綾**. 非アルコール性脂肪肝炎・肝線維症に対する細胞間コミュニケーションの役割と予防剤の探索. 第99回日本生理学会大会シンポジウム（2022年3月、仙台／ハイブリッド開催）

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。