

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。実験1では 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、投与開始 104 週間後に DNA の酸化的損傷マーカー、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルを調べた。実験2では F344 雄性ラット 320 匹を用いて MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与し、実験開始 4 および 13 週間後に 8-OHdG 形成レベルを測定した。実験1ではラット肺における免疫染色を用いた解析では MWCNT-7 および MWCNT-N 投与したラット肺の肺胞上皮細胞、過形成および気管支において 8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が認められた。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。実験2では肺胞上皮細胞において MWCNT-7 および MWCNT-N を 4 週間および 13 週間投与後では 8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が本研究認められたが、SWCNT 投与群では有意な変化を見られなかった。したがって、F344 ラット肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群において核 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。SWCNT が強い酸化的 DNA 損傷を誘導されないことが明らかになった。

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

実験1. 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 8 回投与を行った。ラット肺における免疫染色法および Elisa 法を用いて、8-OHdG 形成レベルの変化を調べた。

実験2. F344 雄性ラット 320 匹を用いて実験開始時より、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT を 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて 8 回投与した。投与開始 4 週間および 13 週間後にラット肺における免疫組織学的解析を用いて DNA 8-OHdG 形成レベルの変化を検討した。

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。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

実験1では右肺は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。肺のパラフィンブロックを3µm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℃で一晩反応させた。免疫染色キット(VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて2次抗体以降を行い、DAB

(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Dojindo Laboratories, 株式会社, 熊本, 日本)およびヘマトキシリンによる対比染色を実施した。

実験2では右肺はブアン(Bouin's solution)で固定し実験1と同様な免疫染色方法を用いて8-OHdG形成レベルを検討した。切片は抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体(1:500、日本老化制御研究所製、静岡、日本)をかけて4℃で一晩反応させた。

4. p62, COX2, GRP78, P-p38 および P-PERK 免疫組織化学的検討

ラット肺4%緩衝パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片について、ABC法による免疫組織化学染色を実施した。マイクロウェーブ照射による抗原賦活化(クエン酸バッファー pH 6)および3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。一次抗体として、anti-p62(SQSTM1)(1:300, PM045, MBL, 東京, 日本); anti-GRP78(78-kDa glucose-regulated protein, 1:250, ab21685, Abcam, 東京, 日本); anti-p38(phosphor T180+Y182, 1:100, ab4822, Abcam, 東京, 日本); anti-COX2(1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA); anti-PERK(phosphor T982)(protein kinase R(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase)(1:100, ab192559, Abcam, 東京, 日本) rabbit polyclonal抗体を用い、4℃にて一晩反応させた。

5. 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

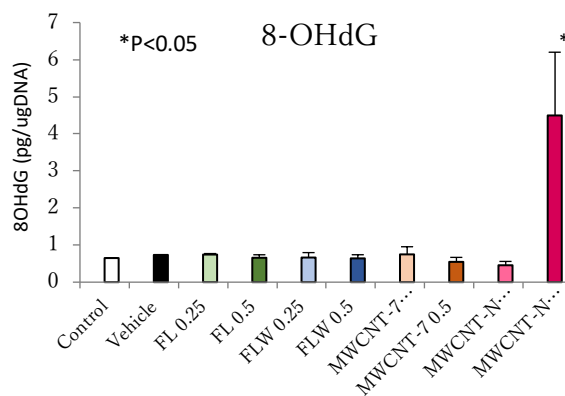
ベルで判定した。統計学的解析は、8-OHdG形成レベル平均値の差について、5%有意水準でBartlett法による等分散検定を行い、等分散の場合は、パラメトリックのDunnett法による両側検定を、不等分散の場合は、ノンパラメトリックのBartlett's法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. 実験1

1-1. 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)

1-2. ラット肺における8-OHdG形成レベル(免疫染色)

免疫染色を用いた解析結果を図2および3に示す。

0.25および0.5 mg/rat MWCNT-7およびMWCNT-Nを投与したラットの肺胞および気管支上皮細胞において、8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が見られた。

FL 0.25および0.5 mg/rat投与群では8-OHdG陽性細胞数は対照群値と同等であった。FLW 0.25および0.5 mg/rat投与群では8-OHdG陽性細胞数の増加傾向が見られた(図2, 3)。

SWCNT 0.5 mg/rat 投与群では第4週および第13週に 8-OHdG 陽性細胞が観察されたが、無処置群と対処群に対して有意な増加は認められなかった。

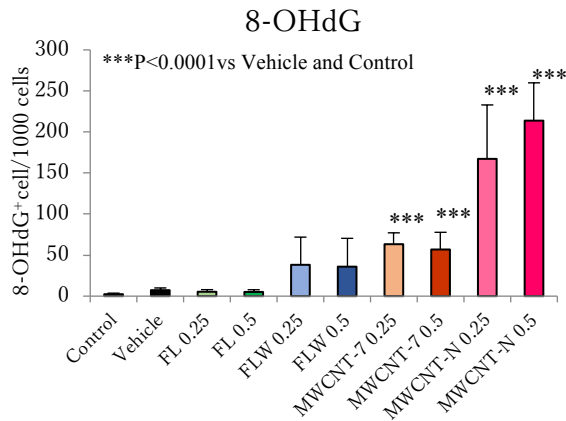


図2. 免疫染色で観察されたラット肺 8-OHdG 形成レベルの上昇

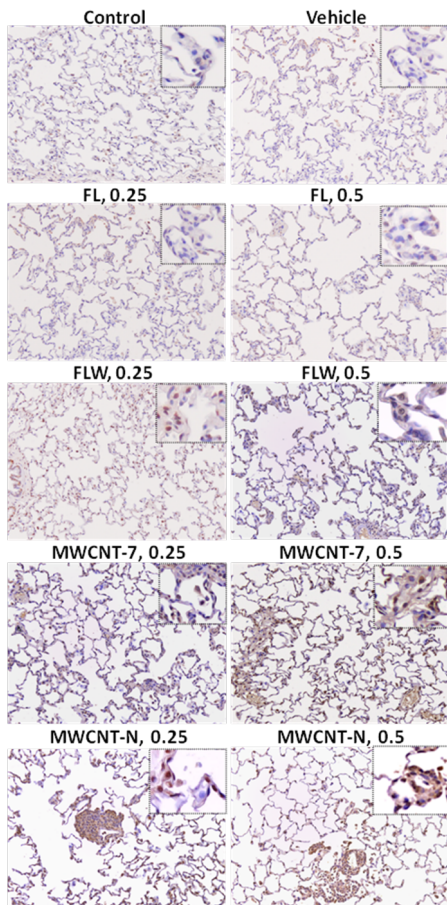


図3. 実験1における 8-OHdG 免疫染色の代表的な写真

2. 実験2

2-1. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

免疫染色を用いた解析結果を図4と図5に示す。0.5 mg/rat MWCNT-7およびMWCNT-N投与群のラット肺胞および気管支上皮細胞において、投与開始4週間および13週間後の8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた(図4(A, B))。

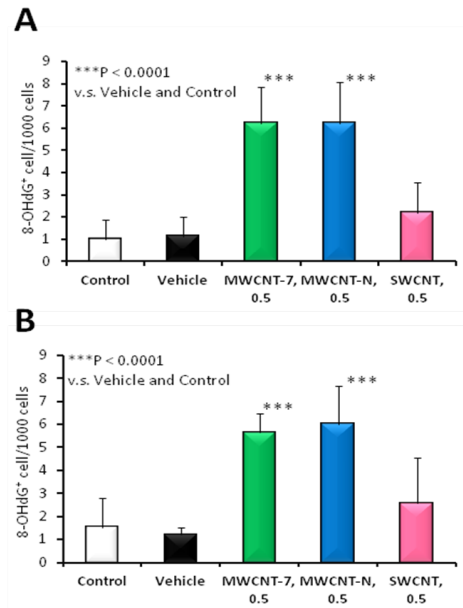


図4. 免疫染色で観察された CNT 投与4週間 (A) および13週間後 (B) ラット肺上皮細胞の 8-OHdG 形成レベル

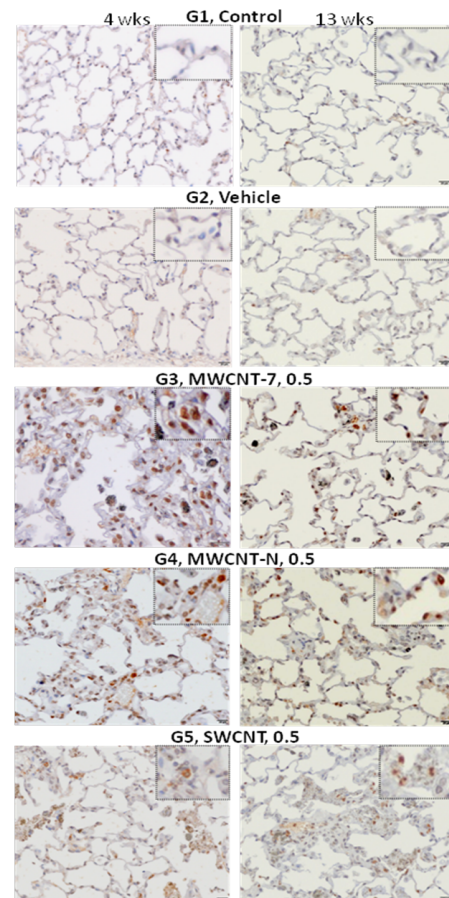


図5. 実験2(4週間および13週間投与後)における 8-OHdG 免疫染色の代表的な写真

MWCNT-7 および MWCNT-N 0.5 mg/rat 投与群のラット 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞の数が上昇していた。また、肺に浸潤した多くのマクロファージ (Mφ) (細胞質や核内) や好中球 (核内) が 8-OHdG 陽性であった (図 5)。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与後のラット肺に多くの 8-OHdG 陽性の Mφ が観察された。しかし、SWCNT 投与群では 8-OHdG 陽性の好中球が多く見られた。

2-2. ラット肺におけるP-p38, p62, COX2, GRP78 およびP-PERKの発現 (免疫染色)

実験2 では0.5 mg/ratの量でMWCNT-7又はMWCNT-N投与した群において、開始13週間後、上皮細胞において酸化ストレス・小胞体ストレスマーカー(p62)および細胞増殖マーカー (リン酸化p38 (P-p38)) の高発現上昇が見られた (図 6)。

MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNT投与ラットの肺上皮細胞、Mφおよび好中球においてCOX2 (図6), GRP78 とP-PERKの高発現が観察された。

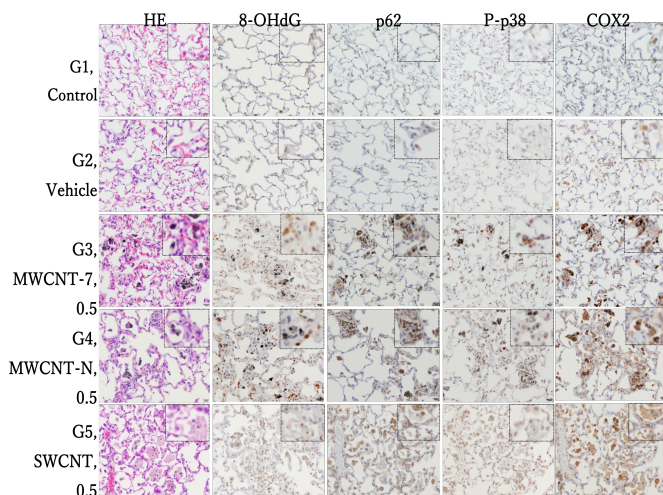


図 6. 実験 2 における肺胞上皮細胞における 8-OHdG, p62, P-p38 および COX2 の免疫染色の代表的な写真 (13 週間投与後)

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、酸化ストレスのよ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。

実験 1 では、0.25 および 0.5 mg/rat の量で MWCNT-7 又は MWCNT-N を投与した群では、投与 104 週間後に肺腺がんの有意な発生が認められており、

肺胞および気管支上皮 DNA 中における 8-OHdG 蓄積に関連していると考えられる。

また、実験 2 では 0.5 mg/rat の量で MWCNT-7 又は MWCNT-N 投与した群において、開始 4 および 13 週間後の 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞が増加するとともに、多くの 8-OHdG 陽性 Mφ 数の上昇が認められたことから、肺胞上皮細胞における酸化ストレスの産生と DNA 損傷は、Mφ 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。

SWCNT 投与群では有意な 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞の数を認められなかったことから、SWCNT が強い酸化ストレス DNA 損傷を引き起こさないと考えられた。肺胞上皮細胞における酸化ストレスの産生と DNA 損傷 (8-OHdG) は、Mφ 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。

実験 2 で観察された MWCNT-7 又は MWCNT-N および SWCNT 投与のラット肺上皮細胞の酸化ストレス・小胞体ストレスマーカー (p62) および細胞増殖マーカー (リン酸化 p38 (P-p38)) の発現が 8-OHdG 形成レベルの変化と相関していることが認められ、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では高い発現が観察された。COX2 の発現が全 CNT 投与群において上昇していた。

E. 結論

F344 ラットの肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では肺胞上皮および気管支細胞の核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い上昇が認められた。しかし、SWCNT 投与群では有意な上昇が認められなかった。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与 104 週間後に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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One*. 17, e0263895, 2022.
2. **Kakehashi A**, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers*. 13: 3613, 2021.
3. **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(6): 1216, 2021.

4. Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Expe Ophthalmol*. 259: 3127-3136, 2021.
2. 学会発表
1. 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. *Pueraria mirifica*のエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会 (2021年6月、東京/ハイブリッド開催)
2. 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がん及び子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会 (2021年6月、東京/ハイブリッド開催)
3. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月、神戸/ハイブリッド開催)
4. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響およびその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「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 (AdAMS)】」若手支援技術講習会 (2021年9月、オンライン開催)
5. 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 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)
6. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミンによる膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝の関係. 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)
7. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん超短期検出法. 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)
8. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 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)
9. 梯アンナ、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)

10. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響および尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
11. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
12. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響およびその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
13. 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
14. 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤 Acetazolamide の Wnt/ β カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)

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。