

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（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 大阪公立大学大学院医学研究科 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、13 および 52 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 形成の誘導および p38、Rac1 および Nrf2 の活性化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0.1および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DNA8-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 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°C 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°C で一晩反応させた。

4. P-p38, p62, COX2, GRP78, P-Nrf2, Ogg1, P-PERK および GRP78 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-p38 (phospho T180+Y182, 1:100, ab4822, Abcam, 東京, 日本); anti-p62 (SQSTM1) (1:300, PM045, MBL, 東京, 日本); anti-COX2 (1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA); anti-GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein, 1:250, ab21685, Abcam, 東京, 日本); anti-

PERK (phospho T982) (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) (1:100, ab192559, Abcam, 東京, 日本); anti-Rac1/cdc42 (phospho S71) (1:100, #2461, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) rabbit polyclonal 抗体、anti-Nrf2 (phospho S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京, 日本)、anti-oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1) (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) goat polyclonal 抗体を用い、4°C にて一晩反応させた。

5. RNA シークエンシング (RNA-Seq) および Ingenuity pathway Analysis (IPA) を用いたシグナリング解析

投与開始 4 週間後の MWCNT-7, MWCNT-N, SWCNT 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)。

および対処群の凍結したラット肺凍結サンプル (12) を用いて、RNA シークエンシング解析

(Macrogen Japan Corp., 日本) を行い、トランスクリプトームの変化を調べた。ラットの肺の凍結サンプルを用いた。

RNA-seq 解析によって対処群のラット肺に比して、過剰発現が確認された蛋白から、IPA (Ingenuity Systems, MountainView, CA, USA) を用いて機能解析、やシグナリング解析を行った。

6. 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。

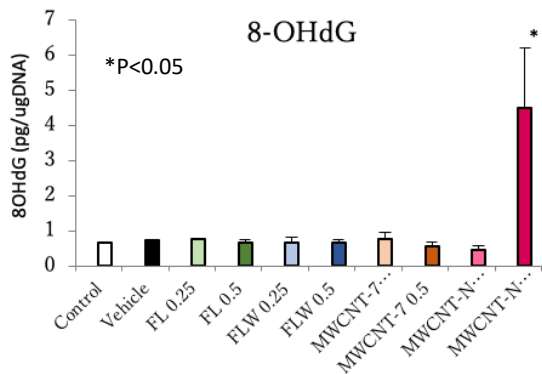


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (E LISA法)

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。

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、13および52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, C))。

SWCNT 0.5 mg/rat投与群では第4、13および第52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。

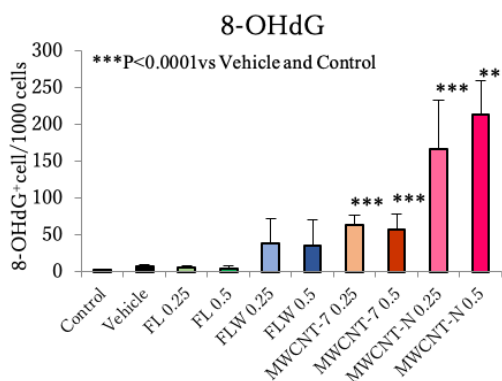


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

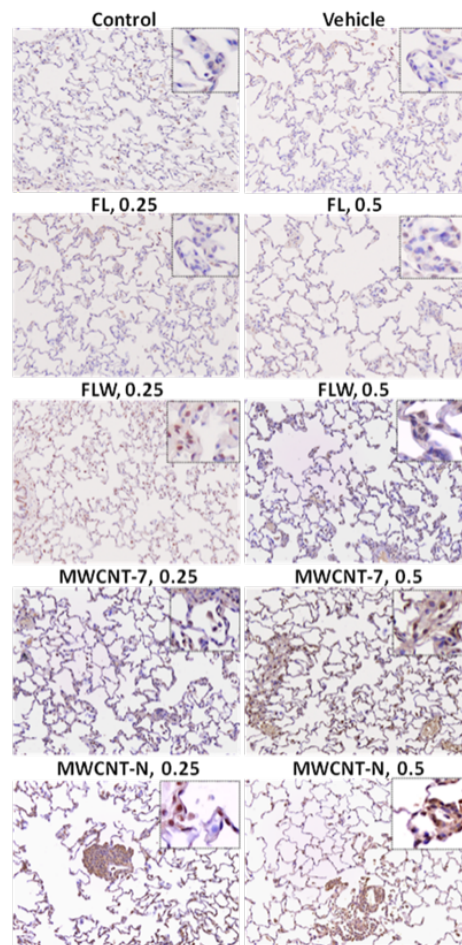


図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

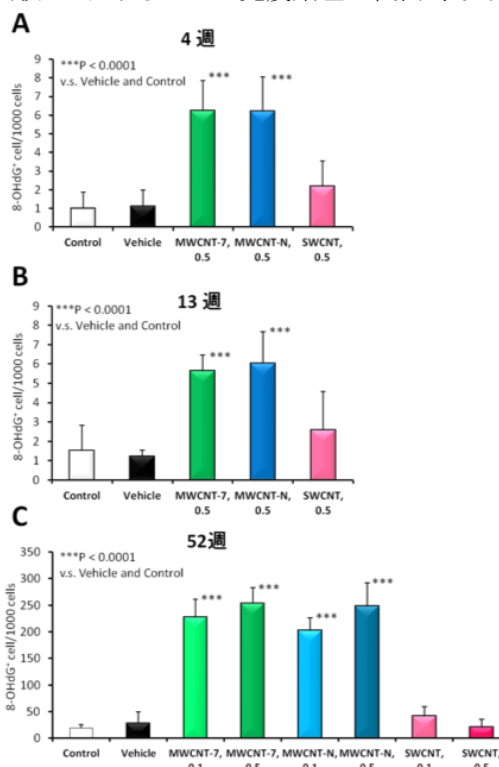


図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

52 週間後の 0.1 mg/rat MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、ラット 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞の数が無処置群と対処群に対して有意に上昇していた。さらに、4、13 および 52 週間投与後、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(図 5)。

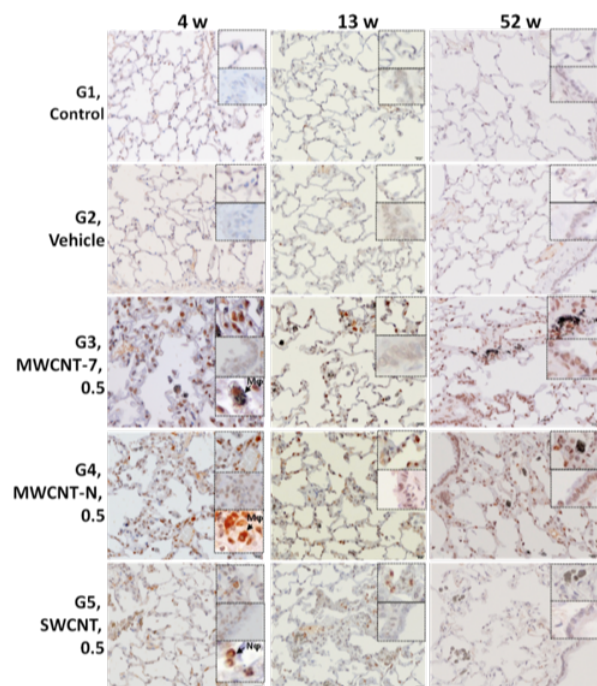


図 5. 実験 2 における 8-OHdG 免疫染色の代表的な写真(4、13 および 52 週間投与後)

2-2. RNA シークエンシング (RNA-Seq) および IPA によるシグナリング解析

実験 2 におけるナノマテリアル 4 週間投与後の肺組織の RNA-Seq 解析し、IPA を用いてシグナリングパスウェー解析を行った。その結果、0.5 mg/rat MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群のみでは窒素および酸化ラジカルの産生、p38 および Rac シグナリングの活性化が予測された。短期投与の場合は MWCNT-7 の影響が一番強く、一方、0.5 mg/rat SWCNT 投与群では Mφ によるフリーラジカルの誘導および p38/Rac1 の活性化が認められなかった。また、SWCNT 投与群ではオートファジーの活性化が予測された(表 1)。

	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5 Vehicle	SWCNT/ 0.5/ Vehicle
Canonical Pathways			
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Mφ	2.18	1.90	1.16
p38 MAPK Signaling	3.53	2.03	1.77
RAC Signaling	2.29	2.19	1.47
Autophagy	1.41	1.72	2.06

Data are z-score (z-score>2: activation)

© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

表 1. RNA-Seq 解析および IPA によるナノマテリアル 4 週間投与後のラット肺組織におけるシグナリングパスウェーの活性化

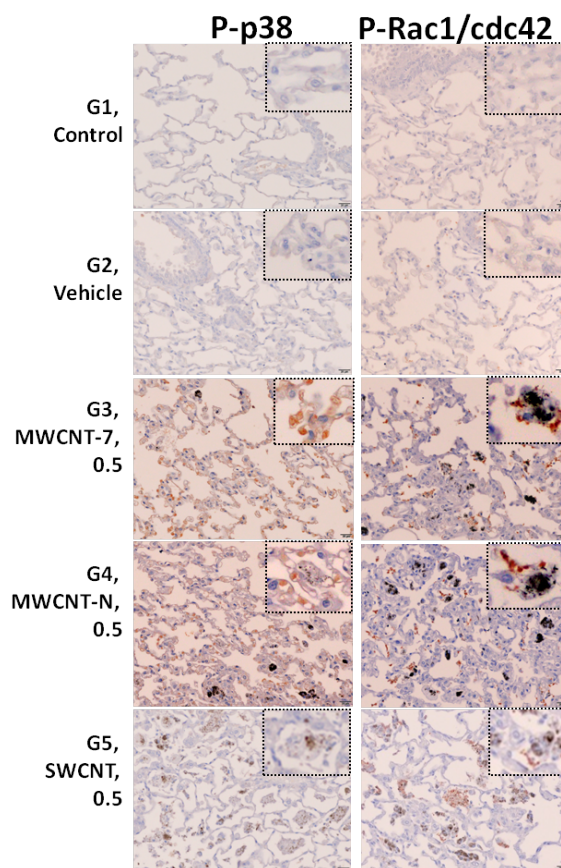


図 6. 実験 2 におけるラット肺胞上皮細胞における P-p38 および P-Rac1/Cdc42 の発現(4 週間投与後)

2-3. ラット肺における P-p38、P-Rac1/Cdc42、P-Nrf2、p62、Ogg1 および COX2 の発現

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、ラット肺上皮細胞において 8-OHdG の発現上昇とともに、細胞増殖マーカー(リン酸化

p38 (P-p38) およびリン酸化 Rac1/cdc42 (P-Rac1/cdc42) の高発現と酸化ストレス・小胞体ストレスマーカー (p62) およびリン酸化 (Ser40) Nrf2 (P-Nrf2) の発現上昇が見られた (図 6、7)。SWCNT 群ではラット肺上皮細胞において P-p38、P-Nrf2 の高い発現が見られなかった。また、Ogg1、P-PERK および GRP78 の免疫染色を行い、全群のラット肺上皮細胞において染色が観察されて、CNTs 群では対処群に比べて有意な変化が認められなかった。さらに、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT 投与後ラットの肺上皮細胞、Mφ および好中球において cyclooxygenase 2 (COX2) の高発現が観察された (図 7)。

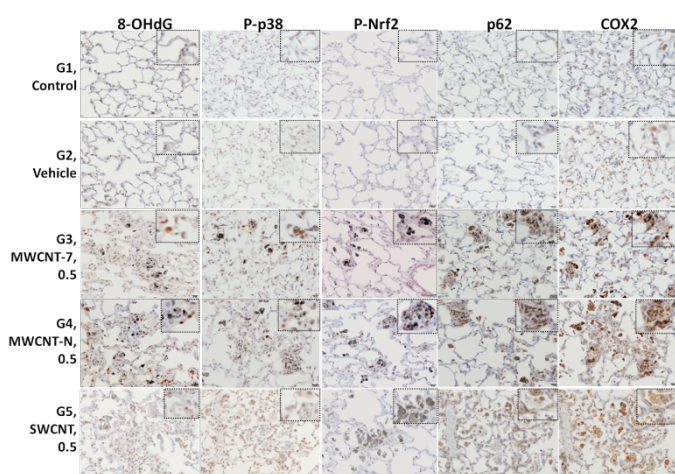


図 7. 実験 2 における肺胞上皮細胞における 8-OHdG, P-p38, P-Nrf2, p62 および COX2 の免疫染色の代表的な写真 (13 週間投与後)

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 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。

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、13 および 52 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 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 投与後のラット肺上皮細胞の酸化ストレス・小胞体ストレスおよび細胞増殖マーカー (p62)、P-Nrf2、P-p38 および P-Rac1/cdc42 の誘導が 8-OHdG 形成レベルと相関し、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では高い値が見られた。COX2 の発現が全 CNT 投与群の Mφ や好中球において上昇していた。しかしながら、SWCNT 投与後では p62 の誘導や p38 および P-Rac1 の活性化が認められなかった。一方、SWCNT 投与群ではオートファジーの誘導が予測できた。

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上皮細胞の核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い上昇および p38/Rac1 および Nrf2 の活性化が認められた。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. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. 488:53483, 2023.
2. Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, **Kakehashi A**, Yonezawa H, Jogo A, Sohga E, Murai K, Ogawa S, Miki Y. Safety and Feasibility of Contrast-Enhanced Computed Tomography with a

- Nanoparticle Contrast Agent for Evaluation of Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumors in a Rat Model. *Acad Radiol.* 30:30-39, 2023.
3. 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.
 4. Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, **Kakehashi A**, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 113: 2642-2653, 2022.
 5. Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, **Kakehashi A**, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 35:247-254, 2022.
2. 学会発表
1. **梯アンナ**、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌の新規バイオマーカー候補の解析、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 2. Guiyu Qiu、**梯アンナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、芝野佳奈、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌における PRDX3 の機能解明、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 3. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、大石裕司、**梯アンナ**、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 4. 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 o-toluidine の尿中代謝物による膀胱尿路上皮癌への影響、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 5. 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、**梯アンナ**、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおける DNA メチル化異常、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 6. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibuno, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, **Anna Kakehashi**, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells, 第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 7. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 8. 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、**梯アンナ**、山本与毅、邱桂ユウ. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおける DNA メチル化異常、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 9. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱ケイギョク、**梯アンナ**、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 10. **梯アンナ**、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序の最近の洞察(シンポジウム)、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. 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)
 12. 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)
 13. 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)

14. 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)
15. 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。