

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

分担研究課題名：カーボンナノチューブ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 准教授

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)、Multiwall carbon nanotube (MWCNT) 7 (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F344雄性ラット320匹を用いてMWCNT-7、MWCNT-NおよびSingle wall carbon nanotube (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、13および52週間後に8-OHdGおよび8-nitroguanosine (8-NG) 形成レベルを測定した。実験2では肺胞上皮および気管支上皮細胞においてMWCNT-7およびMWCNT-Nを4、13および52週間投与後では炎症細胞由来の活性酸素・窒素 (ROS/RNS) により8-OHdG/8-NG形成レベルの有意な上昇が認められた。一方、SWCNT投与したラット肺上皮細胞において4週目から8-NG形成レベルの有意な上昇、8-OHdGの増加傾向およびiNOS/NOSの誘導が見出された。4週間投与後の肺組織のRNA-SeqおよびIPAシグナリングパスウェーと上流調節因子解析結果により、全CNT投与群においてROS/RNSの産生、炎症調節因子TNF α 、細胞増殖やオートファジー調節因子Nf κ B、RELA、Nrf2、p38、Rac1、FAKおよびG-protein coupled 受容体シグナリングの活性化が見られた。実験3ではCarbon nanohorn (CNH)、Carbon nanobrush (CNB)およびMWCNT-7を0.5および1mg/ratの濃度でTIPS法を用いて投与し、投与開始6週間後にラット肺における8-OHdG/8-NGの形成を測定した。その結果、MWCNT-7、CNH、CNB高用量1mg/rat投与群では8-OHdG形成レベルの有意な上昇が認められた。8-NGの形成レベルの有意な上昇がMWCNT-7投与群のみで認められた。CNHやCNB群投与群の8-OHdG/8-NGの形成レベルがMWCNT-7投与群に比べて有意に高い値を示した。F344ラット肺において、MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTの発がん機序にROS/RNSや8-OHdG/8-NG形成の誘導およびTNF α 、p38、Rac1、Nrf2およ

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および8-NGの形成レベルの変化を検討した。

実験3. F344雄性ラット142匹を用いて実験開始時より、Carbon nanohorn (CNH)、Carbon nanobrush (CNB)およびMWCNT-7を0.5と1 mg/ratの濃度でTIPS法を用いて8回投与した。投与開始6週間後にラット肺における免疫組織学的解析を用いて8-OHdGおよび8-NG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。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および**実験3**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℃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) または4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し**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. 免疫組織化学的8-nitroguanosine (8-NG)検査

実験2では右肺はブアン (Bouin's solution) または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-NG形成レベルを調べた。切片はanti-8-NG rabbit polyclonal抗体 (1:20, 10 μ g/ml)、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD、東京、日本)をかけて4℃で一晩反応させた。

実験3では右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、**実験2**と同じに免疫染色ABC法を用いて8-NGの形成レベルを解析した。

5. P-p38, P-Nrf2, p62, iNOS/NOS, COX2, GRP78, P-PERK, Rac1/cdc42およびOgg1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-Nrf2 (phospho S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京、日本)、anti-p62 (SQSTM1) (1:300, PM045, MBL, 東京、日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体 (1:100, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 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-oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1) (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) goat polyclonal抗体を用い、4℃にて一晩反応させた。

6. 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、上流転写制御因子やシグナリング解析を行った。

7. ウェスタンブロットを用いたP-Nrf2, p62およびiNOS/NOS蛋白の発現解析

RIPA buffer (1 $\times$)で筋伸展刺激群および対照群の筋管細胞をセルスクレーパーにて蛋白を回収した。回収した蛋白はBradford法を用いて濃度を測定した。測定は各サンプルをDuplicateで行い、各サンプルの蛋白濃度は濃度の異なるウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) (Sigma-Aldrich)の吸光度から作成した回帰式より算出した。

蛋白濃度測定後にウェスタンブロットを行った。方法は、回収した蛋白をポリアクリルアミドゲルにて分離後、メンブレンに転写し抗体と反応させ目的とする蛋白を検出した。ポリアクリルアミドゲルは目的の蛋白の分子量に応じた7~15%の分離ゲルに4.5%の濃縮ゲルを重ねたものを使用し、蛋白は各サンプルを40 μ gロードして電気泳動した。また、分子量マーカーとして3-Color Prestained XL-Ladder (APRO Co. 徳島、日本)もロードした。電気泳動終了後、分離した蛋白をPVDF Hybond P 0.45メ

ンブレン(Amersham, Germany)に転写した。転写確認後、メンブレンを蒸留水および 0.1%の Tween_20 を含む Tris-buffered saline (1×TBS) (TBST) にて洗浄した。洗浄後、メンブレンは 5%のスキムミルクを含有した PBST で 1 時間室温にて緩やかに振盪を行い、抗体の非特異的な結合を回避した。その後、目的とするタンパクに結合する一次抗体と 4℃で一晩反応させた。一次抗体には、以下に記載した抗体を記載した希釈濃度で使用した。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40 (SAB5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62 (1:1000, ab91526, Abcam, 東京, 日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体(1:2000, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京, 日本)。

8. 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や8-NG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。

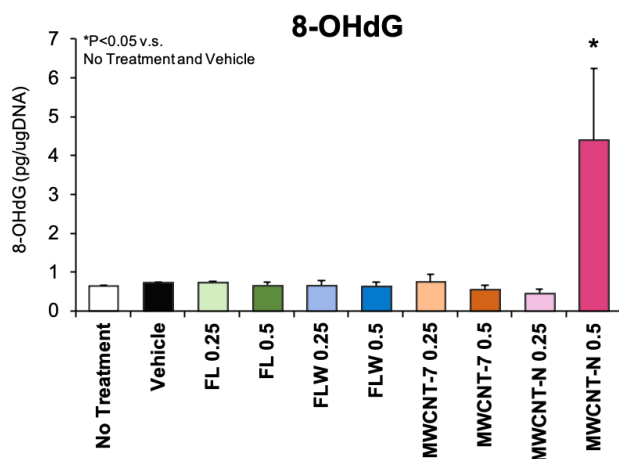


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (ELISA法)

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)。

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

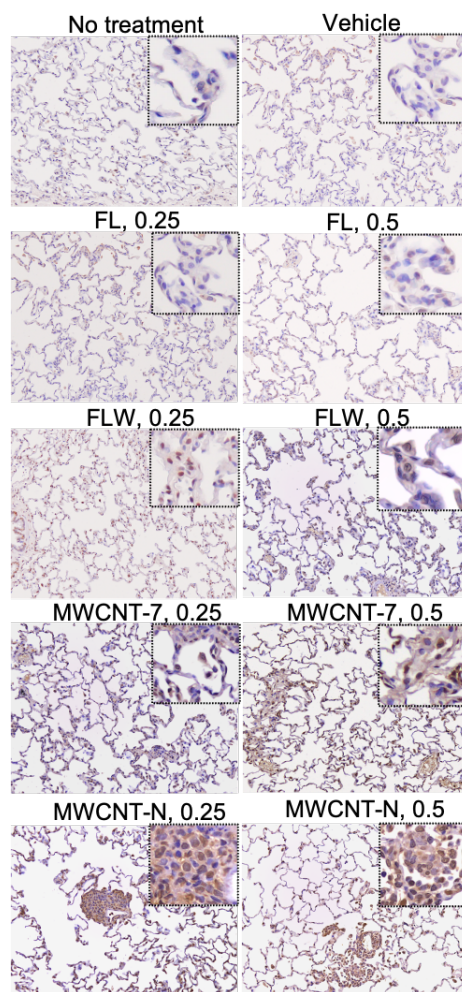
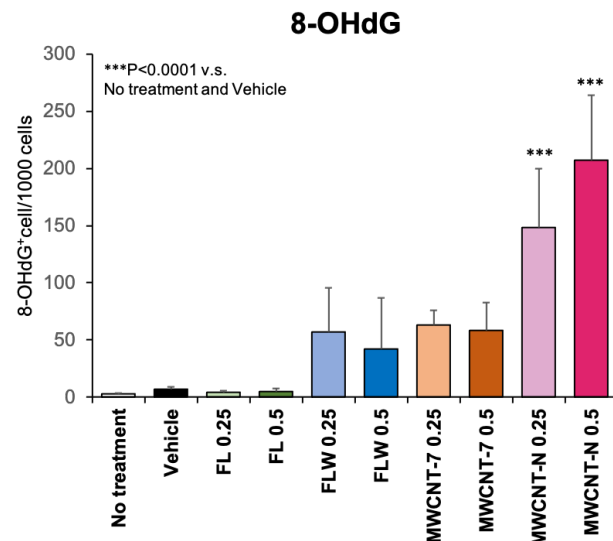


図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

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)

8-OHdG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、52および104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)、図5)。

SWCNT 0.5 mg/rat投与群では第4、13週では8-OHdG陽性細胞数の上昇傾向が見られ、第52および104週では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4(a, b, c)、図5)。

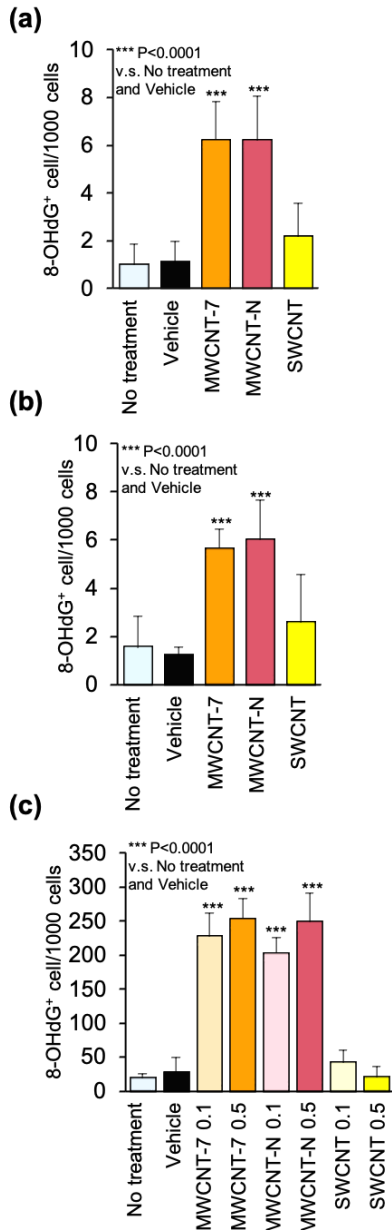


図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (a)、13週間 (b) および52週間後 (c) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

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が、SWCNT群では有意な上昇が見られなかった(図4)。

さらに、MWCNT-7およびMWCNT-NおよびSWCNTの4、13、52および104週間投与後、肺に浸潤した多くの8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)(細胞質や核内)や好中球(Nφ)(核内)が観察され、その数が有意に増加していた(図5, 6)。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。また、SWCNT投与群では8-OHdG陽性MφおよびNφが多く見られた(図5)。

2-2. ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSとCOX2の発現(免疫染色)

8-NG免疫染色を用いた解析結果を図7と図8に示す。SWCNT投与群では13週目からラット8-NG陽性肺上皮細胞、MφおよびNφにおいて投与開始4、13および52週間後の8-NG陽性細胞数(核、細胞質)の有意な上昇が認められた(図7(A, B, C)、図8)。肺に浸潤した多くの8-NG陽性MφやNφ(核と細胞質)が観察された(図7)。また、13週目からMWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群のラット8-NG陽性肺胞上皮細胞の数が増加していた(図7、8)。

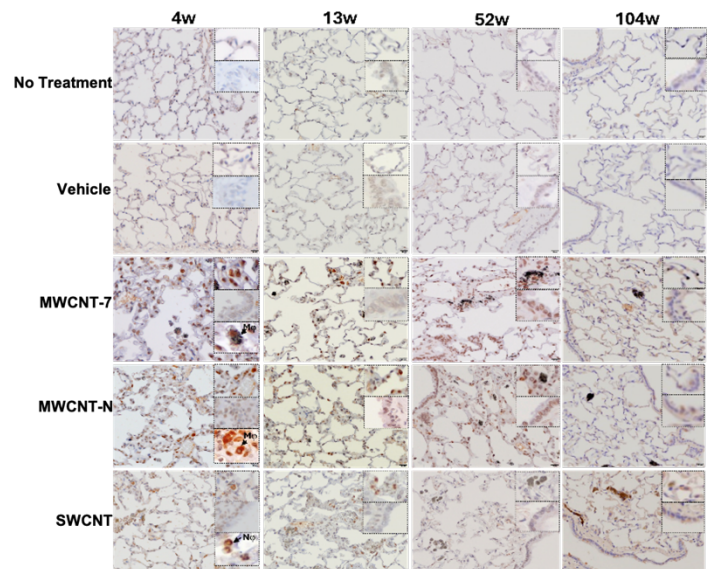


図5. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表的な写真(4, 13, 52および104週間投与後)

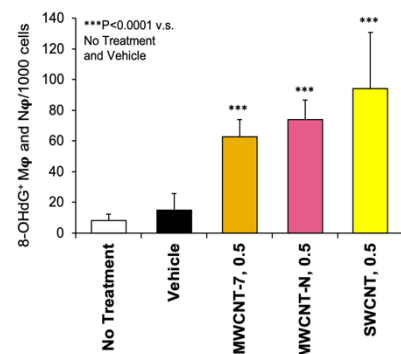


図6. 実験2におけるCNT 13週間投与後ラット肺の8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)と好中球(Nφ)数の上昇

実験2ではMWCNT-7、MWCNT-N又はSWCNT, 0.5mg/rat投与した群のラット肺上皮細胞およびMφやNφにおいて、開始4-52週間後、ラット肺の8-NGの発現上昇と関連して、免疫染色およびウェスタンブロット(WB)解析ではnitric oxide (NO) 産生酵素iNOS/NOSおよび炎症マーカーcyclooxygenase 2 (COX2)の発現上昇が観察された (図9)。

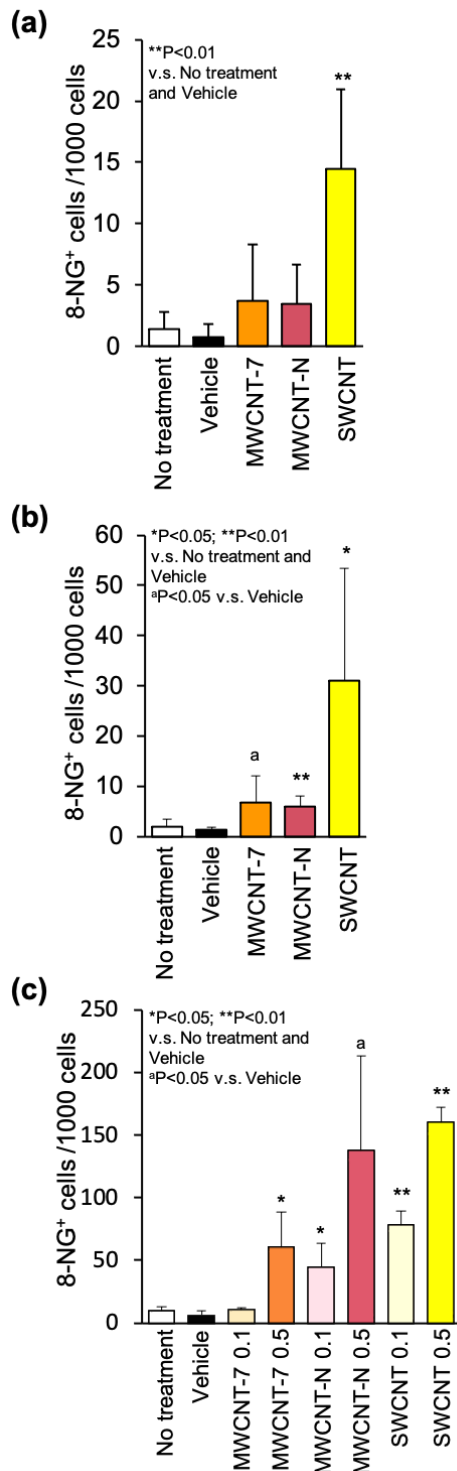


図7. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (a)、13週間 (b) および52週間後 (c) ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

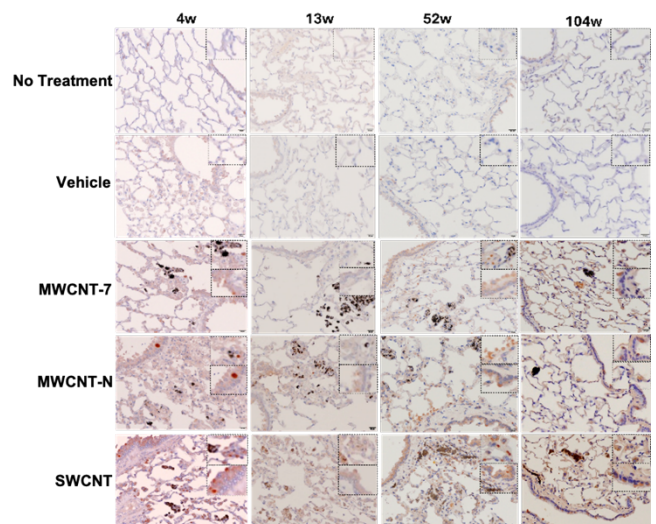


図8. 実験2における免疫染色で観察されたCNT投与の肺上皮細胞のDNAやRNAの8-NG形成レベルの発現

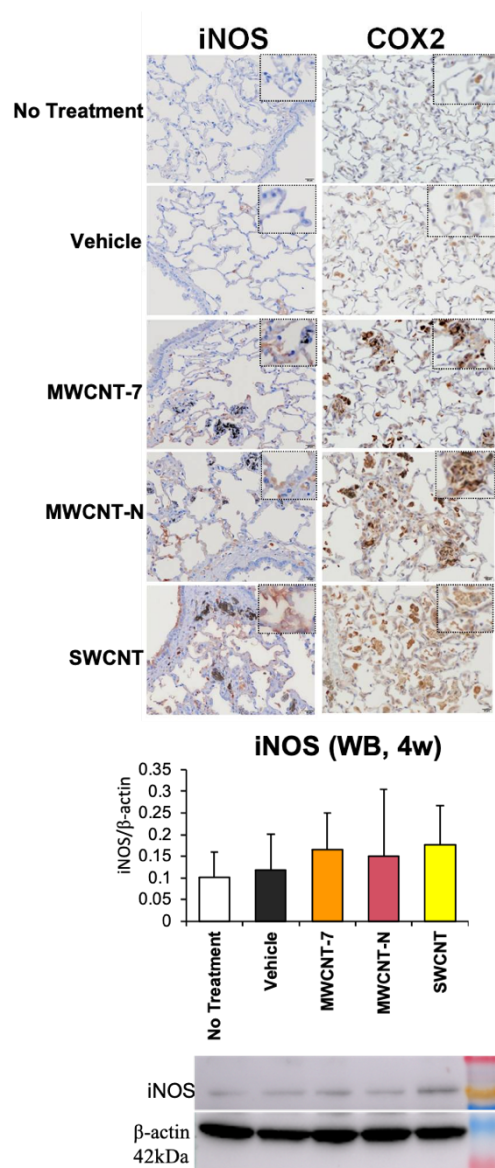


図9. ラット肺におけるiNOSおよびCOX2の発現上昇 (免疫染色, 13週間投与後; WB, 4週間投与後, n=5)

2-3. RNA シーケンシング (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、短期投与の場合は0.5 mg/rat MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNT投与群ではファゴソームの形成、オートファジー、G protein-coupled受容体やFAKシグナリングの活性化が認められた。また、MWCNT-7およびMWCNT-Nの投与群のみで酸化ラジカルの産生によるp38およびRacシグナリングの有意な活性化が予測された(表1)。

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

Regulators	MWCNT-7	MWCNT-N	SWCNT
Immune response			
TNF α	8.05	8.24	8.28
CSF2	8.00	8.16	8.16
CSF3	3.45	3.47	4.57
IL1A	5.55	5.85	5.85
IL1B	5.09	5.61	5.85
IL2	5.42	5.81	5.50
IL6	5.50	5.86	5.86
IL17A	3.90	4.11	4.11
IFNA4	1.94	2.36	3.16
IFNL1	3.65	5.22	5.70
IFNA2	4.00	5.51	5.92
IFNA8	N/A	2.43	2.61
IFNA21	N/A	2.41	2.59
IFNB1	0.64	2.79	2.50
IFNG	7.02	7.42	7.74
IRF3	2.35	4.34	4.61
IRF7	3.71	6.24	6.14
STAT1	3.26	4.23	3.87
STAT2	2.07	3.27	3.73
STAT3	3.94	3.94	4.22
TLR7	4.86	5.13	5.13
TLR4	4.72	4.92	4.92
EIF2AK2	2.81	4.29	4.79
TICAM1	5.03	5.48	5.75
MAVS	5.12	6.04	6.35
Cell proliferation, autophagy			
NFkB	5.33	5.87	6.20
RELA	3.25	3.98	4.27
IKBKE	2.93	3.23	3.51

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2024 QIAGEN. All rights reserved.

実験 2 におけるIPAの上流調節因子解析により0.5 mg/rat MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTの4週間投与の場合は免疫反応関連因子、すなわちTNF α 、CSF2、CSF3、多くのinterleukins (ILs) およびinterferons (INFs)、INF調節因子(IRF3, 7), tall-like receptor 7, 4 (TLR4, TLR7), 転写因子STAT1, 2, 3, TICAM 1, MAVSおよびEIF2AK2の活性化や予測された(表2)。さらに、細胞増殖やオートファジーの調節因子NFkB, RELA, IKBKEおよびの活性化が認められた。

表2. 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調節因子の活性化

Canonical Pathways	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5/ Vehicle	SWCNT 0.5/ Vehicle
Phagosome formation	4.56	4.59	4.59
G protein-coupled receptor signaling	1.83	2.08	2.32
p38 MAPK Signaling	3.53	2.03	1.77
RAC Signaling	2.29	2.19	1.47
FAK signaling	2.99	3.26	3.26
Autophagy	1.41	1.72	2.06

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2024 QIAGEN. All rights reserved.

2-4. ラット肺におけるP-p38、P-Rac1/Cdc42、P-Nrf2、p62およびOgg1の発現

実験 2 では0.5 mg/rat の量では肺中皮腫が発生したMWCNT-7、MWCNT-N投与群では、投与開始4および13週間後、ラット肺上皮細胞において高い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)の高発現と酸化的ストレス・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10, 11)。

SWCNT短期や中期投与後、ラット肺上皮細胞においてP-p38、P-Nrf2の上昇傾向およびp62発現の有意な上昇が観察された(図11)。

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。

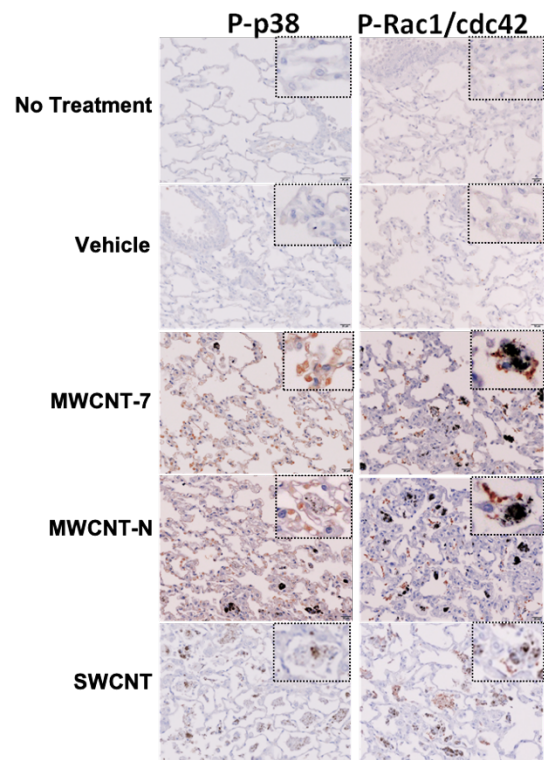


図10. 実験 2 におけるMWCNT-7やMWCNT-N投与後ラット肺上皮細胞におけるP-p38およびP-Rac1/Cdc42の発現(4週間投与後)

ウェスタン・ブロットを用いた解析では、MWCNT-7, MWCNT-N および SWCNT 0.5mg/ml 投与群のラット肺組織において p62 の発現が有意に上昇していた (図 11)。また、MWCNT 投与群では P-Nrf2 の発現は p62 と同様の变化が認められた。

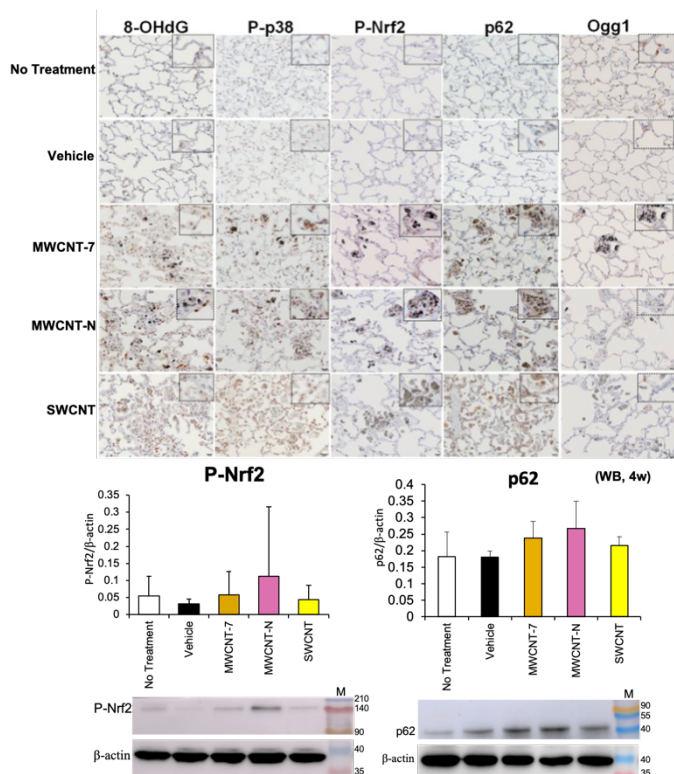


図 11. 実験 2 における肺胞上皮細胞における 8-OHdG, P-p38, P-Nrf2, p62 および Ogg1 の免疫染色 (13 週間投与後) およびラット肺における P-Nrf2 (S40) や p62 の発現 (WB, 4 週間投与後, n=5) の代表的な写真

3. 実験 3

3-1. ラット肺における CNH, CNB および MWCNT-7 投与後の 8-OHdG 形成レベル (免疫染色)

8-OHdG 免疫染色を用いた解析結果を図 12 と図 13 に示す。ラット肺胞および気管支上皮細胞において、MWCNT-7 1mg/rat 投与開始 6 週間後の無処置群および Vehicle に対して 8-OHdG 陽性細胞数の有意な上昇が認められた (図 12、図 14)。

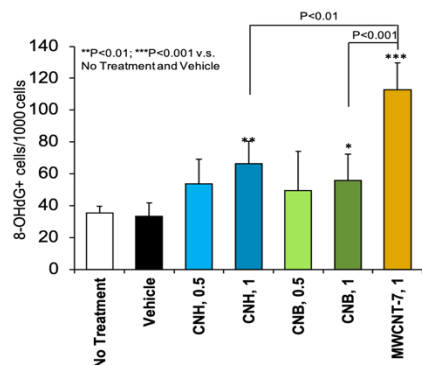


図 12. 免疫染色で観察された CNH, CNB および MWCNT 投与 6 週間ラット肺上皮細胞の 8-OHdG 形成レベル

CNH および CNB 高容量 (1 mg/rat) 投与群ではラット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した (図 12)。また、MWCNT-7 投与群では 8-OHdG 形成レベルの上昇が CNH および CNB 1mg/rat 投与群に比べて、有意に高い値を示した。

3-2. ラット肺における 8-NG 形成レベル (免疫染色)

8-OHdG 免疫染色を用いた解析結果を図 13 と図 14 に示す。ラット肺胞および気管支上皮細胞において、MWCNT-7 1mg/rat 投与開始 6 週間後の無処置群および Vehicle に対して 8-NG 陽性細胞数の有意な上昇が認められた (図 13、図 14)。

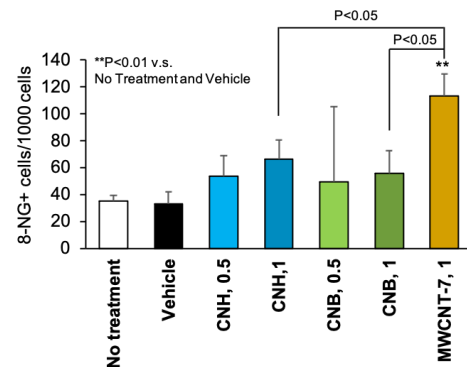


図 13. 免疫染色で観察された CNH, CNB および MWCNT 投与 6 週間ラット肺上皮細胞の 8-NG 形成レベル

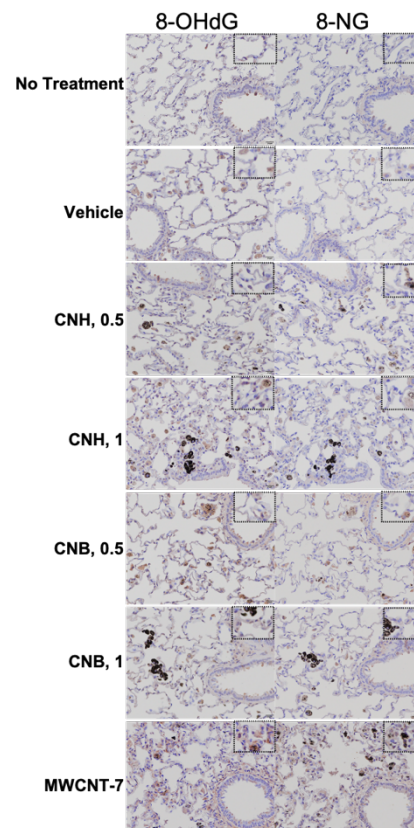


図 14. 免疫染色で観察された CNH, CNB および MWCNT 投与 6 週間ラット肺上皮細胞の 8-NG 形成レベル

CNH および CNB 投与群ではラット肺胞および気管支上皮細胞において 8-NG 形成レベルの変化は見られなかった (図 12)。MWCNT-7 投与群では 8-NG 形成レベルの上昇が CNH および CNB 1mg/rat 投与群に比べて、有意上昇していた。

D. 考察

DNA と ROS/RNS (活性酸素/窒素) の反応により形成される付加体である 8-OHdG および 8-NG は、酸化的/炎症的 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連していることが知られている。8-OHdG/8-NG 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大きく増加するとともに、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的ストレスの産生と DNA 損傷は、主に 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。肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生と 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的ストレス・小胞体ストレスおよび細胞増殖マーカー P-Nrf2、p62、P-p38 および P-Rac1/cdc42 の誘導が 8-OHdG 形成レベルと相関し、高い値が見られた。SWCNT の短期投与後での場合は p38 および P-Rac1 の有意な活性化が認められなかったが、13 週目以降は上昇していた。一方、iNOS/NOS および COX2 の発現が全 CNT 投与群の Mφ や Nφ において上昇していた。

SWCNT 投与群では有意な 8-NG 陽性細胞が見られたことから、SWCNT が強い炎症を伴う DNA および RNA の 8-NG が誘導することが認められた。また、SWCNT 投与群では肺上皮細胞において iNOS/NOS の発現上昇が観察され、NFκB の活性化およびオートファジーの誘導が予測できた。8-NG の形成が SWCNT の肺発がん性に関与している可能性が考えられる。

実験 3 では CNH と CNB 1mg/rat のみで 8-OHdG 形成レベルの増加が認められたが、8-NG レベルの有意な上昇は見られなかった。また MWCNT-7 投与群の 8-OHdG/8-NG の形成レベルの上昇に比べて、CNH/CNB 投与群の 8-OHdG/8-NG レベルの値が有意に減少した。CNH/CNB 投与後は 8-OHdG/8-NG 形成レベルの強い変化は観察されなかった。CNH/CNB と SWCNT、MWCNT の発がん性とそのメカニズムについて

さらに検討する必要がある。

E. 結論

F344 ラットの肺において MWCNT-7、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 NFκB および Nrf2 の活性化が認められた。

また、SWCNT 投与群では、ラット肺上皮細胞の DNA や RNA において有意な 8-NG 上昇が認められていた。MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT 投与 104 週間後に発がん性が見られたことから、その発がん機序に炎症細胞由来の活性酸素および窒素ラジカル (ROS/RNS) による 8-OHdG および 8-NG の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. Sheema A.N, Naiki-Ito A, **Kakehashi A**, Ahmed O.H.M, Alexander D.B, Alexander W.T, Numano T, Kato H, Goto Y, Takase H, Hirose A, Wakahara T, Miyazawa K, Takahashi S, Tsuda H. Fullerene and fullerene whisker are not carcinogenic to the lungs and pleura in rat long-term study after 2-week intra-tracheal intrapulmonary administration. Arch Toxicol. 98, 4143-4158, 2024.
2. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 38(1): 59-67 2024.
3. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 38(2), 147-154, 2024.
4. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 38(2):161-165, 2024.
5. Tagami M, Kasashima H, **Kakehashi A**, Yoshikawa A, Nishio M, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Yashiro M, Azumi A, Honda S. Stromal area differences with epithelial-mesenchymal transition gene changes in conjunctival and orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Front Oncol. 14:1277749, 2024.
6. Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. Arch Toxicol. 98(7):1-20, 2024.
7. Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis (2-chloroaniline) in humanized-liver mice. Toxicol Sci. 202(2):210-219, 2024.
8. **梯アンナ**. プロポリスの抗がん作用の解明. News

2. 学会発表

1. 内木綾、**梯アンナ**、加藤寛之、津田洋幸、高橋智. 多層および単層カーボンナノチューブの肺・胸膜発がん性の比較. 第 41 回日本毒性病理学会総会 (2025 年 1 月、静岡)
2. **Anna Kakehashi**, Yusaku Nishidoi, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Vachiraarunwong Arpamas, Masaki Fujioka, Min Gi, Hideki Wanibuchi. PRDX3 as a novel biomarker of human invasive pancreatic ductal carcinoma, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)
3. Shugo Suzuki, Min Gi, Masaki Fujioka, Arpamas Vachiraarunwong, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Effects of apocynin, NADPH oxidase inhibitor, on o-toluidine-induced urinary bladder proliferation, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)
4. Ikue Noura, Shugo Suzuki, **Anna Kakehashi**, Takeshi Inoue, Hideki Wanibuchi. Examination of new biomarker candidates for large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)
5. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)
6. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Development of Rapid Models for Predicting Genotoxic Hepatocarcinogenicity in Rats, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)
7. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl- N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis, 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024 年 9 月、福岡)

G. 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。