

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 7 年度 分担研究報告書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 准教授

研究要旨

化学物質のナノサイズ化により、機能や特性が飛躍的に向上することから、ナノマテリアル(NM)の新素材としての使用や生産が増大する一方で、吸入暴露による毒性影響が懸念される。カーボンナノチューブ(CNT)は難分解性で体内に蓄積し得ることから、肺胞上皮および胸膜中皮に毒性・発がん性を誘発する可能性がある。一方、OECD が求める吸入暴露試験は施設・費用面の制約が大きく、動物使用の削減(3R)を意識した、より実用的かつ効率的な評価体系の確立が課題である。そこで本研究は、大規模吸入施設を必要としない経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を基盤に、長期発がん性(104週)と整合する短期(4週・13週)有害性指標およびAdverse Outcome Pathway(AOP)の同定と、陰性CNTおよび化学発癌物質(DHPN/NNK)との比較による発がん機序を整理することで、将来的に*in vitro*評価へ移行可能な*in vivo*参照軸を提供し、OECD TG化に資する基盤データを構築することを目的とする。

本年度は、発がん性陽性対照(MWCNT-7、MWCNT-N)と発がん性が未知であったSWCNTを同条件でTIPS投与し、104週発がん性と短期(4週・13週)指標の対応を検討した。あわせて、Ki67、 γ H2AX等の病理・分子指標と炎症性遺伝子を用いて、腫瘍発生前段階のKey Event(KE)候補を評価し、発がん性陰性CNT、化学発癌物質との比較により発がん性と連結するKEの絞り込みを行った。さらに、投与後4週肺サンプルのRNA-seqに基づくGO/KEGG解析とqRT-PCRにより陽性CNTに特異的な経路および候補マーカーを抽出・検証した。

その結果、SWCNTは肺発がん性が陽性である一方、胸膜中皮腫誘発性は明確に支持されないという発がんプロファイルを示し、CNT種(物性)により標的臓器・機序が異なる可能性が示唆された。短期指標として、Ki67および γ H2AXは複数CNTで4週から上昇し13週まで持続し、腫瘍発生前のスクリーニング指標として有用であった。炎症性遺伝子ではCcl2/Ccl3が共通して上昇し、Il-1b/Tnfaは高発がん感受性群で持続上昇した。RNA-seqでは陽性CNTで炎症・自然免疫/異物応答経路が一貫して富化し、Spp1/Ccl2/Mmp12が候補マーカーとして抽出・検証された。

以上より、本分担研究では、TIPS法によりCNTの長期発がん性と腫瘍発生前段階で検出可能な短期KE候補を対応づけた。SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、MWCNTとは異なる発がんプロファイルを示した。また、Ki67、 γ H2AX、Ccl2/Ccl3、Il-1b/Tnfa等は、CNTの発がん性や発がん感受性を反映する短期有害性指標として有用であると考えられた。さらに、発がん性陽性CNTと陰性CNTの比較解析により、Spp1、Ccl2、Mmp12等を候補マーカーとして抽出・検証した。これらの成果は、CNTの短期有害性評価および*in vitro*評価系で測定すべき反応の選定に資する*in vivo*参照軸となりうる。

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種の多層(MW)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。本研究グループではこれまでに、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。さらにR2-6年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)においては、発がん性陽性MWCNTsによる活性化マクロファージ(M ϕ)によるケモカイン、活性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化的DNA損傷の促進を投与後早期(4週)に検出し、CNT毒性のAdverse Outcome Pathway(AOP)として期待された。さらにR6年度は、単層(SW)CNTのTIPS投与後2年間の解析により、MWCNT-7およびMWCNT-Nが肺・胸膜発がんを発生させる条件において、SWCNTが肺発がん性を有し、胸膜発がん性は有さないことを初めて明らかにするとともに、投与後4週において、MWCNTと同様のAOPが観察されることを確認した。

本年度は、MWCNTs(MWCNT-7、MWCNT-N)とSWCNTの

TIPS投与後、発がん期（104週）における肺発がん性と一致する、亜急性期（4週）、亜慢性期（13週）に観察可能な有害性指標を選定するため、4、13週における各指標の経時的変化を病理学的解析、遺伝子解析により明らかにするとともに発がん性陰性物質における変動も確認する。これらにより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し、*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成果体やOECD TG/IATAに提案できる評価法を開発する。

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（No treatment）およびPFポリマー液投与（対照、vehicle）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[1CNTにつき77匹設定：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-1640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、Mφ局在（抗CD68抗体、BIO-RAD）、増殖活性（抗Ki67抗体、Abcam）、DNA損傷（ γ H2AX抗体、CST）の程度について免疫組織学的に解析する（内木）。52週以降では、肺及び胸膜中皮の腫瘍性病変についても定量解析する。左肺は凍結し、RNA抽出（ISOGEN、ニッポンジーン）と定量的RT-PCRによる*Ccl*種、*Ii*種や*Tnf- α* 等の炎症性ケモカイン、サイトカイン発現の定量に用いる。

(2) *In vivo* 実験：TIPS投与によるCNT負荷試験と亜急性期遺伝子変化の解析

(1) *In vivo*試験と同様の方法で、肺発がん性陽性CNT（MWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT、SWCNT）、最近長期試験において肺発がん性陰性を実証したCNT（CNH、CNB）（論文投稿中）を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取し、免疫染色、NGSを用いたRNA-seq解析、定量的RT-PCR解析に用いる。CNTにより変化するトランスクリプトームについて、GO解析、パスウェイ解析を行う。既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)を4,000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)を200mg/kgの用量で、1回/週にて4週間（計4回）投与し、CNTによる肺発がん機序との比較対照として用いる。

(3) *In vitro*実験：Mφ細胞を用いたCNTによる毒性の解析（内木）

マウスMφ細胞（RAW264.7）に、CNTsを投与し48時間培養する。マウスMφ細胞から産生される炎症性サイトカイン（定量的RT-PCR）を定量する。

（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、医動23-047）、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)-1. CNTのTIPS投与による肺胞沈着と免疫細胞の反応

まず、R6年度までに明らかとなり、本研究の基盤となる2年間発がん性試験の結果を概説する。胸膜中皮発がん：臓側および壁側胸膜における悪性中皮腫の発生率は、MWCNT-7およびMWCNT-Nの高用量群（0.5 mg/rat）において有意に増加した。一方、SWCNT投与群においても低用量・高用量群で各1例の発生が見られたが、統計学的な有意差は認められず、本試験においてSWCNTによる中皮腫誘発性は結論づけられなかった。肺発がん：肺腺癌の発生率は、MWCNT-NおよびSWCNTの高用量群において有意に増加した。また、肺腫瘍全体（腺腫と腺癌の合計）の発生率においても、これら2群で有意な上昇が確認された。なお、既知の肺発がん物質であるMWCNT-7において有意な肺癌発生頻度の上昇が見られなかった要因は、中皮腫による早期死亡例が多発し、肺がん発生に必要な観察期間が十分に確保できなかったためと結論づけられた。

以上の発がんプロファイルの違いを踏まえ、CNT投与後の肺における沈着状況と免疫細胞の反応を検討した。4、13、52、104週的全観察期間を通じ、CD68免疫染色によりCNT投与群における肺胞Mφの集積が確認された。特にSWCNT投与群では、高度な好中球浸潤の併発が認められた（図1）。光顕およびSEM観察において、MWCNTs群では肺胞Mφによる食食像に加え、線維が細胞膜から突き刺さる「突出像」が確認された。対照的にSWCNT群では、Mφによる食食は確認されたものの、線維は細胞内に完全に内包されており、表面への露出は明らかではなかった。また同群では、Mφの崩壊に伴いSWCNTが肺胞内へ再放出される像も観察された（図2）。

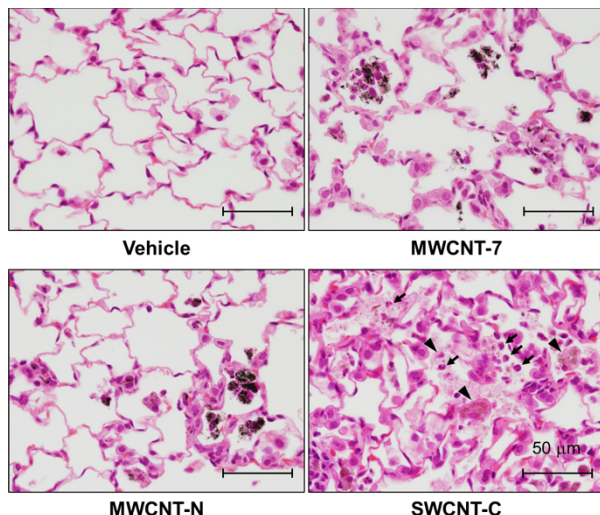


図1. 肺胞MφによるCNTの貪食とSWCNTによる好中球遊走 (HE像)。

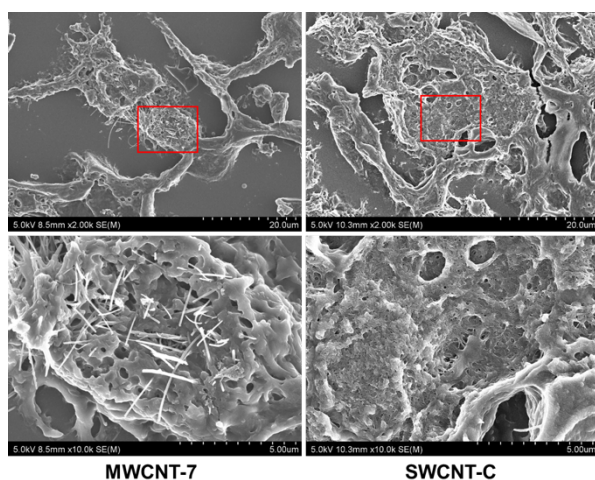


図2. 肺胞MφによるCNTの貪食 (SEM像)。

(1)-2. CNTによる肺有害性指標の動態解析 (Ki67、 γ H2AX)

増殖活性およびDNA損傷指標について4週と13週の定量的比較を行ったところ、多くの指標で4週からの変化が持続していた。Ki67および γ H2AX陽性率は、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTのいずれの群においても、4週時点ですでに有意な上昇を示し、その傾向は13週まで持続した (図3、4)。

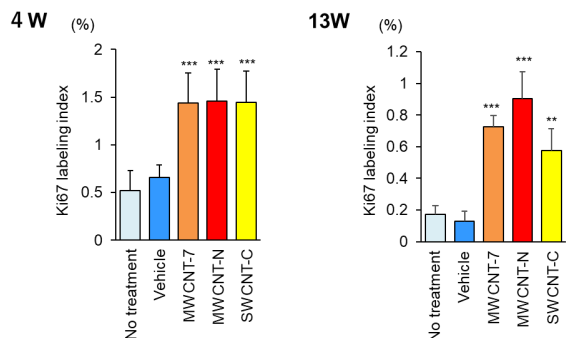


図3. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

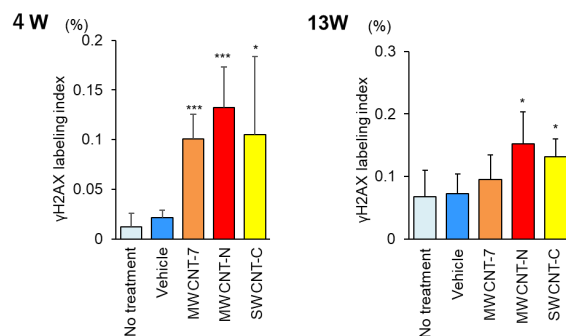


図4. CNT投与による肺胞上皮DNA損傷の変化 (γ H2AX免疫染色)、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

(1)-3. CNTによるケモカイン、サイトカインmRNA発現の動態解析 (定量的RT-PCR)

4および13週における肺のケモカイン、サイトカインおよび炎症関連遺伝子のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した (図5, 6)。ケモカインCc12およびCc13の発現は、4週・13週の両時点において、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTの全投与群で一貫して有意に上昇した。Cc19はMWCNTs群では両時点で、SWCNT群では13週時点で有意な上昇を示した。炎症性サイトカインについては、Il6が全投与群の4週時点で有意に上昇した。Il-1b、Tnfaは高発がん感受性であるMWCNT-NおよびSWCNT群において、4週・13週を通じて有意な上昇を認めた。すなわち、曝露早期からのCc12/Cc13の共通した上昇はCNTの発がん性の有無を鋭敏に捉えるスクリーニング指標として有用であり、さらにIl-1bやTnfa等の発現プロファイルは、MWCNT-NやSWCNTが示すより高い発がん性強度を反映する指標となり得ることが示唆された。

(2)-1. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較 (RNA-seq)

本研究グループの長期発がん性試験により肺腫瘍誘発性が確認されたCNTを肺発がん性陽性CNT (MWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT、SWCNT) として用いた。また、長期試験で肺発がん性が認められていないCNT (CNH、CNB) を肺発がん性陰性CNTとして比較対象に用いた。TIPS投与後4週または化学発癌物質投与後4週の肺凍結サンプルを用いたRNA-seq解析により、発がん性陽性CNTにより変動する遺伝子群を解析した。まず発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNTで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を75個、低下する遺伝子を27個得た。GO解析では、発がん性陽性CNT群で優位に変動する遺伝子セットは、免疫・炎症応答、とくに白血球の遊走・走化性に関連する機能カテゴリに強く集約された (図7, 8)。KEGG解析では、発がん性陽性CNTで補体系/凝固系およびサイトカイン・ケモカインを中心とした炎症性ネットワークが優位に富化していた。加えて、細胞骨格調節やリソソーム、酸化リン酸化などの経路も抽出され、炎症に伴う細胞機能変化・ストレス応答の関与が示唆された (図9)。GO解析とKEGG解析をまとめると、発がん性陽性CNTでは、免疫細胞の動員と炎症性シグナルの持続を基盤として、補体・凝固系を含む組織傷害・修復の反復や

自然免疫の活性化が進行し、これに細胞機能・代謝の変化（細胞骨格、リソソーム、ミトコンドリア代謝など）が重なることで、腫瘍微小環境の形成や発がん過程に寄与する可能性が考えられた。

次に化学発癌物質DHPNと比較して発がん性陽性CNTで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を701個、低下する遺伝子を95個得た。GO解析では、骨髄系・好中球などの免疫細胞の活性化と動員、受容体リガンドを介したサイトカイン／ケモカインシグナルに強く富化した。また、エンドソーム・リソソーム系、NADPHオキシダーゼ複合体、細胞外小胞が上位に抽出され、異物処理・ROS関連経路を含む炎症性微小環境形成が関与する可能性が示された。KEGG解析では、発がん性陽性CNTはDHPNと比べて、炎症性サイトカイン／ケモカイン、補体・凝固、食食ーリソソーム、NOD様受容体を軸とする 自然免疫・異物応答型の分子経路が強く富化しており、炎症性微小環境形成、すなわち非遺伝毒性寄りのプロモーション要素がメカニズムとして示唆された。

さらにCNT発がん性予測バイオマーカー候補を得るため、発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNTで有意に上昇する上位遺伝子群を抽出した(図10)。その結果、先に示したGO/KEGG結果と整合し、発がん性陽性CNTではマクロファージマーカー (Spp1、Mmp12)、ケモカイン群(Ccl2、Ccl17、Ccl19、Cxc16)の発現上昇が認められ、炎症性微小環境の形成が強く誘導されることが示された。

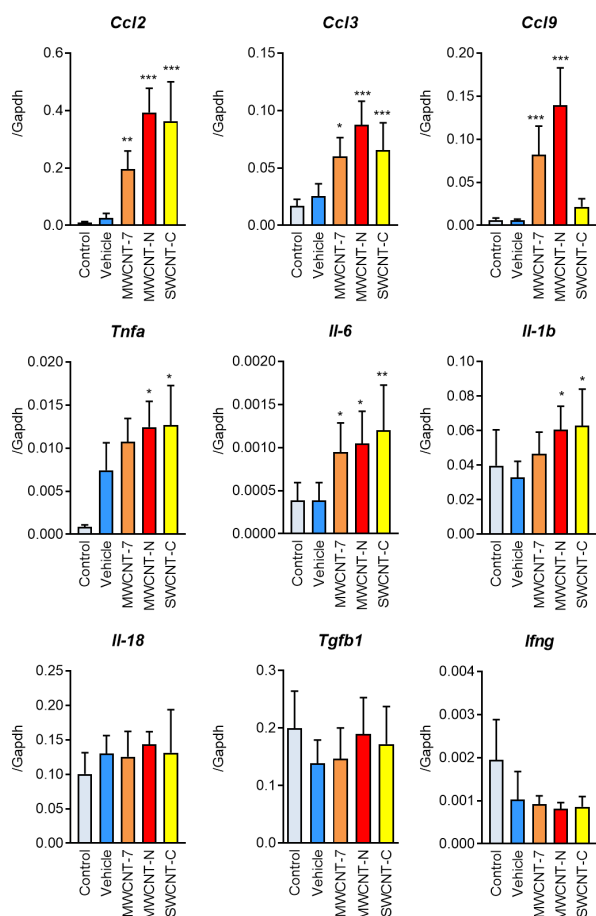


図5. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、

4週（定量RT-PCR）、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

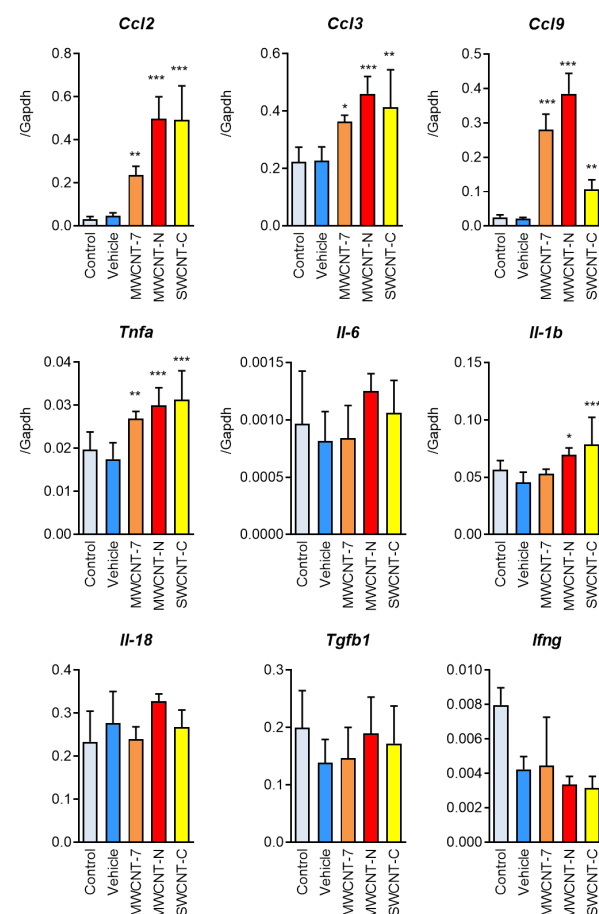


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、13週（定量RT-PCR）、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

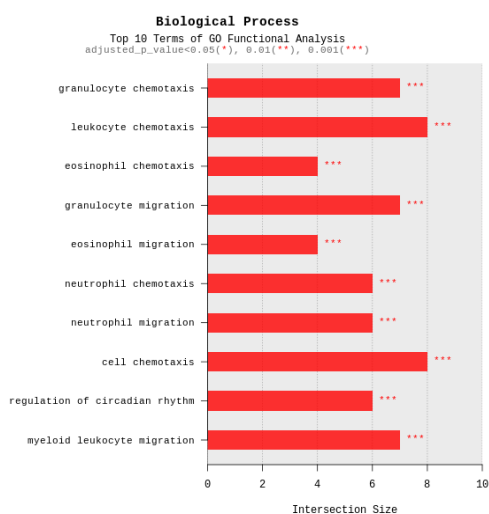


図7. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Biological Function)、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

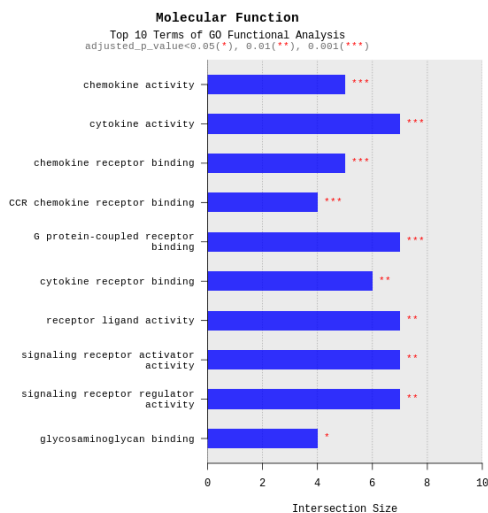


図8. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

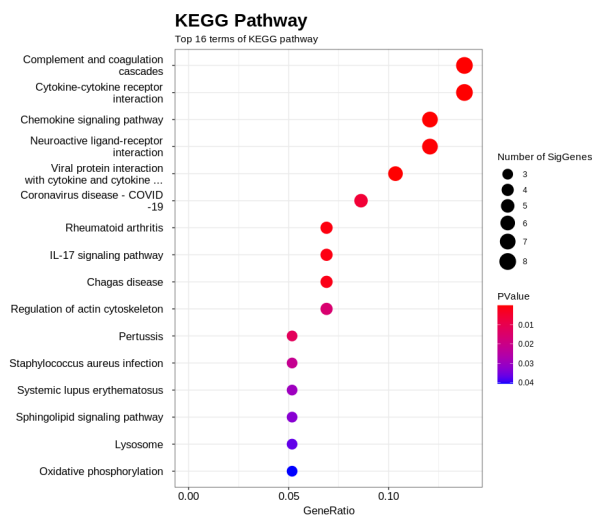


図9. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、KEGG解析、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

Transcript_ID	Gene_Symbol	Description	Positive / Negative.fc
NM_012881	Spp1	secreted phosphoprotein 1	5.705335
NM_053963	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	5.557572
NM_001108643	Tmem72	transmembrane protein 72	4.649582
NM_019224	Rgs9	regulator of G-protein signaling 9	4.033824
NM_001007612	Ccl7	C-C motif chemokine ligand 7	3.966989
NM_001012357	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	3.706637
NM_001100990	Rspo3	Respon din 3	3.591108
NM_001107642	Tubb1	tubby like protein 1	3.435893
NM_013182	Mec5r	melanocortin 5 receptor	2.809814
NM_022214	Cxcl6	C-X-C motif chemokine ligand 6	2.773024
NM_031560	Ctsk	cathepsin K	2.748505
NM_031530	Ccl2	C-C motif chemokine ligand 2	2.742889

図10. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、TOP高発現遺伝子、発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

(2)-2. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較(定量的RT-PCR)

そこで、次にSpp1、Mmp12およびCcl2遺伝子発現につ

いて、定量的RT-PCRにて確認した。その結果、発がん性陽性CNTでは Spp1、Ccl2、Mmp12発現が誘導されることが確認された。これらは陰性CNTでは相対的に弱く、またDHPNでは同等の誘導が目立たない傾向を示したことから、CNT特有の炎症性微小環境形成と組織改変を反映する発がん性予測マーカー候補として有望であると考えられた(図11)。

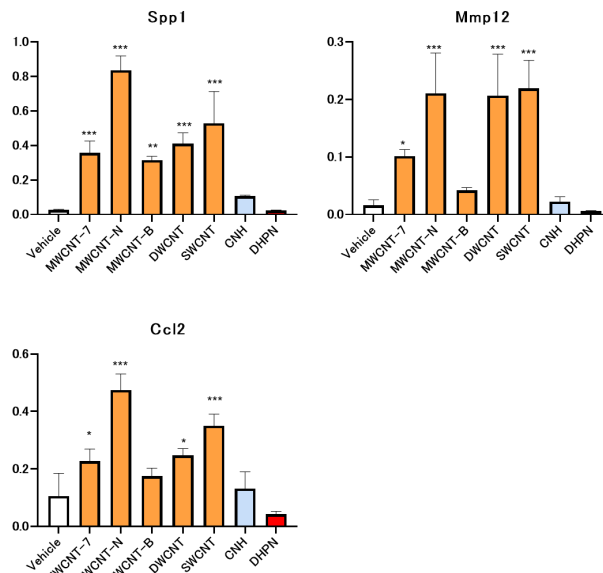


図11. 肺mRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(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、*in vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めたCcl2種のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。10 μg/mlの濃度では、肺発がん感受性の高いMWCNT-Nでは発現上昇傾向が見られたが、肺発がん性陽性(Positive)と陰性(Neg)で有意な変化は見られなかった(図12)。そこでMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTにおいて、さらに高濃度で投与した結果、濃度依存性に有意なCcl2発現の上昇を認めた(図13)。

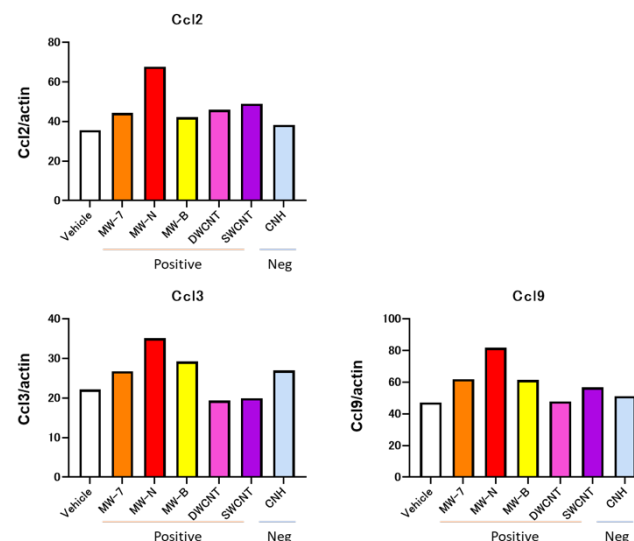


図12. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

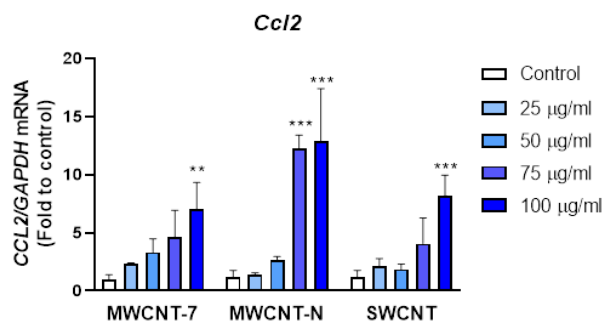


図13. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

D. 考察

TIPS法は、大規模吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺・胸膜中皮における毒性および発がん性評価を可能にする。複数のMWCNTで2年発がん性が示されてきた背景を踏まえると、投与・解析手順の標準化により、得られた有害性指標を迅速な健康影響評価へ展開できる可能性が高い。安定した投与手法、解析手法により経時的に観察しCNTの有害性を正確に捉えることにより、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の抽出や毒性発現機構の解明が期待できる。

本年度の解析では、SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、MWCNTとは異なる発がんプロファイルを示した。短期指標として、肺胞上皮の増殖活性 (Ki67) およびDNA損傷 (γH2AX) は、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTのいずれにおいても4週から上昇し、13週まで持続した。したがって、Ki67およびγH2AXは、腫瘍発生前段階でCNT有害性を捉えるスクリーニング指標として有用である可能性が高い。また、炎症性遺伝子応答では、Ccl2/Ccl3が4週・13週を通じて広く上昇し、Il-1bおよびTnfaはMWCNT-N、SWCNTなど高い肺発がん感受性を示す群で持続的に上昇した。これらの結果から、Ccl2/Ccl3はCNT曝露に共通する早期反応を反映し、Il-1b/Tnfaは発がん性の強度や持続的炎症を反映するKey Event (KE) 候補として位置づけられる。

RNA-seqに基づくGO/KEGG解析では、発がん性陽性CNTにおいて、サイトカイン/ケモカインシグナル、免疫細胞の動員・活性化、補体系、食食ーリソソーム系、NOD様受容体など、炎症・自然免疫/異物応答を中心とする経路が一貫して富化していた。これらの所見は、CNTによる反応が単なる一過性の急性炎症ではなく、免疫細胞集積を伴う持続的炎症および異物応答を反映している可能性を示すものである。さらに、qRT-PCRにより、Spp1、Ccl2、Mmp12の発現上昇が発がん性陽性CNTで確認された。Spp1およびCcl2はマクロファージを中心とした炎症性微小環境形成や免疫細胞リクルートに関与し、Mmp12は慢性炎症下でのマクロファージ活性化および組織リモデリングを反映する。したがって、これらの候補マーカーは、CNT曝露後早期に生じる炎症・組織改変反応を捉える短期KE候補として有用であると考えら

れる。

また、発がん性陰性CNTおよび化学発癌物質との比較により、発がん性陽性CNTでは、炎症・自然免疫応答、免疫細胞動員、食食ーリソソーム系、組織リモデリング関連経路が相対的に強く誘導されることが示された。これらの結果は、CNT発がんにおいて、DNAへの直接作用のみならず、マクロファージ/ケモカイン系を中心とした持続的炎症、組織傷害・修復反応の反復、および炎症性微小環境形成が重要である可能性を支持する。

本研究で得られた長期発がん性に裏付けられた短期KE候補は、*in vitro*評価系の妥当性確認に用いる*in vivo*参照軸として重要である。今後、*in vitro*評価へ応用するためには、*in vivo*で抽出されたKE候補が培養系で再現されるかを確認するとともに、被験物質の分散条件、暴露濃度、暴露時間、細胞種・共培養条件など、評価系としての条件設定を整理する必要がある。これらの検討により、TIPS法で得られた*in vivo*知見を、3Rに資する短期・簡便な評価体系へ橋渡しでき、将来的にOECD TG/IATAへの接続を検討する上でも基盤情報となると考えられる。

E. 結論

TIPS法を用いて、CNTの長期発がん性 (104週) と腫瘍発生前段階 (4週・13週) で観察可能な短期指標との対応を検討した。発がん性陽性対照であるMWCNT-7、MWCNT-Nと同条件でSWCNTを評価した結果、SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、CNT種により標的臓器や発がんプロファイルが異なる可能性が示された。短期指標として、Ki67およびγH2AXは複数CNTで上昇・持続し、Ccl2/Ccl3、Il-1b/Tnfa等の炎症性遺伝子応答も発がん性や発がん感受性を反映する指標となり得ると考えられた。さらに、RNA-seqおよびqRT-PCR解析により、発がん性陽性CNTでは炎症・自然免疫/異物応答経路が一貫して富化し、Spp1、Ccl2、Mmp12等が候補マーカーとして抽出・検証された。以上より、本分担研究では、CNTの長期発がん性に裏付けられた短期KE候補と候補マーカーを整理し、*in vitro*評価系で測定すべき反応の選定に資する*in vivo*参照軸を提示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimizu N, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Sugiyama Y, Nagai T, Etani T, Morikawa T, Gonda M, Aoki M, Ishikawa D, Umemoto Y, Takahashi S, Yasui T. Establishment of a Patient - Derived Xenograft Model of a Testicular Yolk Sac Tumor. *Pathol Int.* in press.
- Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, **Kakehashi A**, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, **Naiki-Ito A**, **Tsuda H**, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials (Basel)*. 15(23):1806, 2025.
- Kawamura H, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kuang X, Murakami A, Komura M, Suzuki T, Kato H, Nagayasu Y, Matsuura K, Fujiwara K, Kataoka H, Takahashi S. Sacubitril/Valsartan Attenuates Inflammation and Fibrosis Associated With

- Decreased Integrin $\alpha 8$ and Inhibits Hepatocarcinogenesis in a Rat Model of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2025, in press.
4. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, **Naiki-Ito A**, Abdallah S, **Tsuda H**. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol.* 2025, in press.
 5. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, **Tsuda H**, **Naiki-Ito A (Corresponding)**. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials (Basel).* 15(18):1402, 2025.
 6. Odagiri K, Mimura Y, Naiki T, Tasaki Y, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Etani T, Nagai T, Morikawa T, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Yasui T, Furukawa-Hibi Y. Efficacy and safety of anamorelin in patients with metastatic urothelial carcinoma receiving systemic chemotherapy: a randomized controlled study. *Oncologist.* 30(7):oyaf167, 2025.
 7. Kuang X, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kawamura H, Murakami A, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Takahashi S. Hepatic stellate cell inhibition by angiotensin II receptor blocker mitigates liver injury and fibrosis via NF- κ B-galectin-3 suppression in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *Arch Toxicol.* 99(8):3393-3412, 2025.
 8. Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Murakami A, Kato H, Sugiyama Y, Kawai T, Kato S, Etani T, Nagai T, Shimizu N, Morikawa T, Aoki M, Gonda M, Kuang X, Nagayasu Y, Hamamoto S, Yasui T, Takahashi S. Preliminary Evidence on Safety and Clinical Efficacy of Luteolin for Patients With Prostate Cancer Under Active Surveillance. *Prostate Cancer.* 2025:8165686, 2025.
 9. Ahmed OHM, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Alexander WT, Alexander DB, **Tsuda H**. A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung. *Nanomaterials (Basel).* 15(3):168, 2025.
 10. Yanase T, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Okawa R, Niwa S, Shimizu N, Hamamoto S, Fujii Y, Takahashi H, Yasui T. Efficacy of prostatectomy using a Retzius-sparing approach as an additional excision in anal canal carcinoma after brachytherapy for prostate adenocarcinoma. *IJU Case Rep.* 8(2):174-178, 2025.
 11. **Naiki-Ito A**, Naiki T, Takahashi S. Exploring experimental models of prostate cancer in chemoprevention: Oxidative stress as a key pathway to translational research. *Pathol Int.* 75(3):131-144, 2025.
 12. Matsumoto D, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Aoki M, Kato S, Morikawa T, Shimizu N, Gonda M, Umemoto Y, Yasui T. Efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib as first-line treatment for metastatic renal cell carcinoma with multiple brain metastases. *IJU Case Rep.* 8(1):5-9, 2025.
 13. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Nagai T, Etani T, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Morikawa T, Banno R, Kubota H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Experience and prognostic analysis with avelumab switch maintenance treatment in metastatic urothelial carcinoma. *Oncology.* 17:1-11, 2025.
2. 学会発表
 1. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリンの有効性に関する臨床的評価と miR-29 の役割、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 2. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋智. マウス膵炎モデルのプロテオーム解析による膵炎・膵癌における Actinin-4 発現、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 3. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. CD81 発現間質細胞は浸潤性乳癌において腫瘍抑制的な微小環境を誘導する、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 4. 加藤寛之、**内木綾**、村上明寛、山内妙子、高橋智. 膵発癌の起点となる慢性膵炎の初期変化の解明、第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月、九十九里、千葉)
 5. **内木綾**、河村逸外、Kuang Xiaochen、小村理行、加藤寛之、高橋智. モデル動物で探る MASH を基盤とした肝発がんの病態と予防の可能性、シンポジウム「動物モデルから得られた貴重な知見」、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 6. 内木拓、三村佳久、**内木綾**、恵谷俊紀、永井隆、森川敏治、清水伸彦、青木マリア、権田将一、安井孝周. 全身化学療法を受ける尿路上皮癌患者へのアナモレリンの有効性と安全性の検証、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 7. 森川敏治、**内木綾**、長安祐子、石川大樹、青木マリア、権田将一、清水伸彦、永井隆、恵谷俊紀、内木拓、河合憲康、安井孝周、高橋智. ラットにおける前立腺発癌に対する高脂肪食の促進効果の解析、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 8. 村上明寛、**内木綾**、加藤寛之、高橋智. ルテオリンによる microRNA 誘導と前立腺癌抑制機構の解明、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 9. **内木綾**、加藤寛之、**梯アンナ**、**津田洋幸**、高橋智. 単層カーボンナノチューブの肺発がん性と多層カーボンナノチューブとの比較評価、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 10. 村上明寛、**内木綾**、内木拓、加藤寛之、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリン誘導 miRNA の影響、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 11. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. 乳癌細胞に発現する CD63 は腫瘍抑制性マクロファージを誘導することで転移を抑制する、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、

金沢)

12. 王程博、小村理行、加藤寛之、長野愛矢、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 大腸がん腫瘍細胞およびがん関連線維芽細胞における CD99 発現とその意義、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
13. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 膵炎・膵癌における Actinin-4 とリン酸化 Actinin-4(S160)発現と機能解析、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
14. 内木綾. 病理研究者からみた癌取扱い規約の意義と発展性、シンポジウム「必要なのか、取り扱い規約!」、第 71 回日本病理学会秋期特別総会 (2025 年 11 月、名古屋)
15. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Alexander DB., Takahashi S., Tsuda H. Comparative analysis of early pulmonary gene expression changes induced by carbon nanotubes and chemical carcinogens in rat lungs (第 42 回日本毒性病理学会学術集会 令和 8 年 1 月 21-22 日 名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし・

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし