

酸化・ニトロ化DNA損傷を介した 炎症関連発がん機構の解明とリスク評価への応用

Mechanism of inflammation-related carcinogenesis via
oxidative and nitrative DNA damage and evaluation of cancer risk

平工 雄介
Yusuke Hiraku

キーワード

炎症、活性酸素・窒素種、DNA損傷、発がん、リスク評価

1 はじめに

ヒトの発がんの大部分は環境因子に起因すると考えられているが、とりわけ感染症および慢性炎症は食品因子、たばこに次ぐ重要な環境発がん因子である。慢性炎症は細菌、ウイルス、寄生虫による感染症、感染によらない炎症性疾患(炎症性腸疾患など)、物理化学的因子(アスベスト、紫外線など)などにより惹起される。最近では慢性炎症が世界のがんの約25%に寄与するという推算がある(1)。また、国際がん研究機関(International Agency for Research on Cancer, IARC)は、感染症が全世界の発がん要因の約18%に寄与すると推算している(2)。しかし、感染・炎症関連発がんの分子機構には未だ不明な点が多い。

2 炎症関連発がん と DNA 損傷

炎症条件下では、炎症細胞や上皮細胞などから活性酸素種や活性窒素種が過剰に産生される。これらの活性種は非常に反応性が強く、遺伝子の本体であるデオキシリボ核酸(DNA)を損傷する。その結果生じる酸化・ニトロ化DNA損傷ががん関連遺伝子における突然変

異をもたらし、炎症関連発がんに重要な役割を果たすと考えられる(図1)。活性酸素種は炎症条件下のみならず、環境化学物質やその代謝物、およびミトコンドリアの電子伝達系などからも産生される。一方、活性窒素種は炎症を主たる産生源とする。したがって、活性窒素種を介したニトロ化DNA損傷塩基は、炎症関連発がんのバイオマーカーとして応用できる可能性が考えられる。

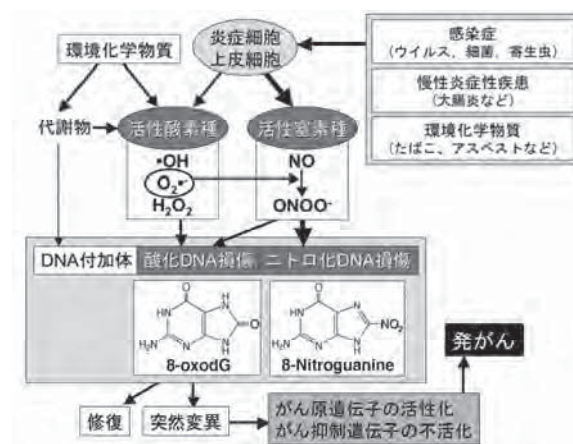


図1 炎症条件下における酸化・ニトロ化DNA損傷塩基の生成

8-ニトログアニンとは、炎症条件下で生成されるニトロ化DNA損傷塩基である。炎症細

胞などから産生される一酸化窒素(NO)とスーパーオキシド($O_2^{\bullet-}$)の相互作用によりペロキシナイトライト($ONOO^{\bullet}$)が生じ、さらに DNA 塩基のグアニン(G)と反応して 8-ニトログアニンが生成されることは、以前から試験管内の実験により明らかにされている(3)(図 1)。DNA 中で生成された 8-ニトログアニンは化学的に不安定であり、遊離して脱プリン部位(apurinic site)を形成する。修復を受けなかった脱プリン部位は、DNA 複製時に、G と対合していたシトシン(C)に代わってアデニン(A)と対合しやすく、さらに次の複製の際にその A がチミン(T)と対合した結果、G:C → T:A 変異が起こる(図 2)。したがって、8-ニトログアニンは変異誘発性 DNA 損傷塩基と考えられる。

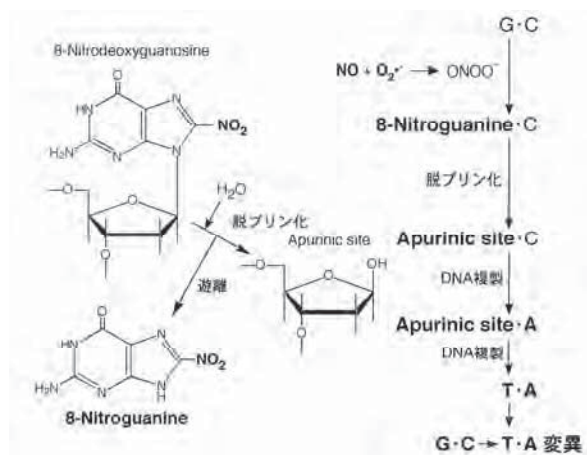


図 2 DNA 中で生成された 8-ニトログアニンの遊離と突然変異

我々は、これまで活性酸素・窒素種による DNA 損傷を指標とした、有害環境因子の発がんリスク評価法の確立を目的として研究を行ってきた。最近では、生体内の 8-ニトログアニン生成を炎症関連発がんの共通の分子機構として注目し、種々の炎症関連がん患者やモデル動物の組織標本を得て、免疫組織染色法による解析を行っている。実験には、独自に作成した抗 8-ニトログアニンウサギポリクローナル抗体を用いている(4)。その結果、8-ニ

トログアニンが炎症関連発がんに先駆けて、がんの発生日で生成されることを世界で初めて明らかにした(5-7)。さらに、8-ニトログアニン生成の強さががん患者の予後に関連することを明らかにした(5)。

本稿では、a)アスベストに曝露した実験動物、b)アスベスト曝露歴を有するヒトの肺組織、c)ナノ素材で処理したヒト培養細胞、d)タイ肝吸虫に感染させた実験動物の肝組織における DNA 損傷塩基の生成を解析した結果について述べる。実験方法の概略を図 3 に示す。ヒト生体試料を用いた研究については、三重大学医学部倫理審査委員会の承認のもとで行った。

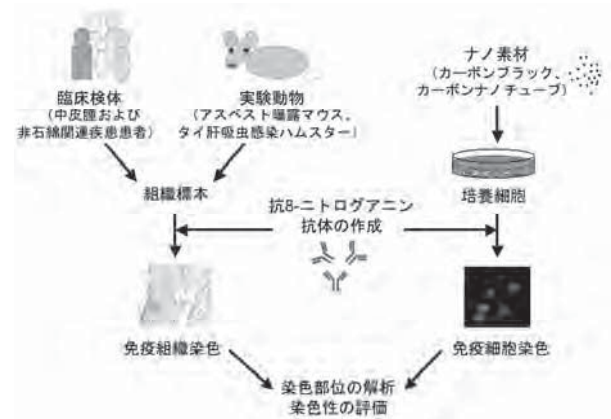


図 3 8-ニトログアニンの解析方法の概略

3 アスベスト曝露マウスの肺組織における DNA 損傷

アスベスト(石綿)とは、天然に存在する繊維状珪酸塩鉱物の総称であり、蛇紋石族[クリソタイル(白石綿)]と角閃石族[クロシドライト(青石綿)、アモサイト(茶石綿)など]に分類される。アスベストは、耐熱性、耐薬品性、電気絶縁性、耐摩耗性に優れるとの理由から建設業をはじめとする幅広い業種で使用されてきた。しかし、アスベストの曝露を受けた労働者や近隣住民に悪性中皮腫や肺がんなどの健康障害が多発し、重大な社会問題となってい

る。アスベストは吸入曝露により呼吸器で慢性炎症を惹起し、発がんに必要な役割を果たすと考えられるが、その分子機構は現在でも十分解明されていない。

本研究ではアスベストとして、クリソタイル、およびより発がん性の強いクロシドライトをマウスに気管内投与した。その後、肺組織のパラフィン切片を作製して免疫組織染色を行い、8-ニトログアニンと酸化 DNA 損傷塩基 8-オキシデオキシングアノシン(8-oxodG)の生成および誘導性 NO 合成酵素(iNOS)の発現について解析した。

その結果、8-ニトログアニンと 8-oxodG の生成および iNOS の発現は、主に気管支上皮細胞で認められた。これらの染色性を画像解析ソフトで定量的に評価した結果、クリソタイルを投与した場合に比べて、クロシドライトの方が DNA 損傷塩基を有意に強く生成するという注目すべき知見を得た(7)。クロシドライトは重量比で約 30%の鉄を含有するが、クリソタイルでは微量にとどまる。したがって、アスベストによる炎症反応に起因する活性酸素・窒素種に加えて、特に前者に多く含まれる鉄が直接活性酸素種の生成を触媒して DNA 損傷を起こし、より強い発がん性を発揮する可能性が考えられる。

4 ヒト肺組織における DNA 損傷とアスベスト曝露との関連

我々はさらに、ヒト肺組織における DNA 損傷について検討し、アスベスト曝露との関連を解析した。本研究では、悪性中皮腫患者の肺組織と腫瘍組織、および非石綿関連疾患患者の肺組織の剖検標本あるいは手術標本を得て、パラフィン切片を作成した。組織中の DNA 損傷塩基の生成および iNOS の発現については免疫組織染色を行い、光学顕微鏡下で各視野の染色性の強さをスコア化し、全視野の平均値を計算して染色性を評価した。組織

中のアスベスト繊維[クリソタイルおよび角閃石系石綿(クロシドライトなどを含む)]については、組織を低温灰化し、透過型分析電顕法により乾燥組織重量あたりの繊維を計数した。その結果と、DNA 損傷塩基および iNOS の染色性との相関を統計学的に解析した。

8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の生成と iNOS の発現は、肺組織の気道上皮細胞、肺胞上皮細胞および炎症細胞で認められ、また中皮腫患者の腫瘍細胞でも認められた。肺組織中のアスベスト繊維量は悪性中皮腫群で非石綿関連疾患群に比して有意に多かった。肺組織における 8-ニトログアニンと iNOS の染色性は、両群を通じて角閃石系石綿の量と有意に相関したが、クリソタイルとは相関を認めなかった。非石綿関連疾患群では 8-ニトログアニンと 8-oxodG の染色性が角閃石系石綿の量と有意に相関したが、悪性中皮腫群では相関を認めなかった。以上の結果から、8-ニトログアニンなどの DNA 損傷塩基は、特に発がんに至る過程において、アスベストの曝露指標および発がんリスクの評価指標として応用できる可能性が期待される。

5 ナノ素材による細胞内 DNA 損傷

ナノ素材とは少なくとも一辺の大きさが 100 nm 以下の人工的に合成された微粒子である。近年、工業や医療などの分野における応用が急速に拡大しているが、一方で曝露を受けたヒトへの健康影響が懸念されている。一部のナノ素材については動物実験で発がん性が報告されている。

カーボンブラックはタイヤなどのゴム製品、インク、塗料などの用途に使用されているが、ラットへの吸入曝露で肺がんをもたらしことから、IARC で group 2B(ヒトに発がん性を有する可能性がある)と評価されている(8)。カーボンナノチューブは、半導体など多様な用途への応用が期待されているが、実験動物への

腹腔内投与により中皮腫を起こすことが報告されている(9)。ナノ素材は吸入曝露により、肺組織で慢性炎症を惹起し、発がんをもたらす可能性が考えられる。特に、カーボンナノチューブは繊維状の形状を示すことから、前述のアスベストと類似の挙動をして発がんをもたらす可能性が懸念されている。

本研究では、カーボンブラックおよび多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を細胞培地(5 %胎児ウシ血清含有 DMEM)に懸濁して超音波処理により凝集体を分散し、遠心して粗大粒子を沈殿させて得た上清を実験に用いた。分散したナノ素材を含む上清をヒト肺癌上皮培養細胞 A549 に添加して一定時間培養し、免疫細胞染色法により 8-ニトログアニンの生成について検討した。

その結果、カーボンブラックと MWCNT はいずれも細胞核で 8-ニトログアニンを生成した。興味深いことに、一次粒径 95 nm のカーボンブラックは一次粒径 56 nm の場合より短時間で 8-ニトログアニンを生成し、粒径の違いによる DNA 損傷性の差異を認めた。これらのナノ素材による 8-ニトログアニン生成および iNOS 発現は、カベオラおよびクラスリン依存性のエンドサイトーシスに対する阻害剤により抑制された。透過型電子顕微鏡による観察では、カーボンブラックおよび MWCNT が細胞質内のリソソーム様小胞に取り込まれている像を認めた。以上の結果から、ナノ素材はエンドサイトーシスを介して肺上皮細胞に取り込まれ、細胞内で活性酸素・窒素種の産生を誘導し、DNA 損傷を起こして発がんをもたらす可能性が考えられる。

6 タイ肝吸虫感染ハムスターの肝組織における DNA 損傷

タイ肝吸虫はタイ東北部を中心に分布する寄生虫であり、肝内胆管癌をもたらす。この地域では肝吸虫に汚染された魚の生食の習慣

があり、肝内胆管癌の罹患率が高く、重要な健康問題となっている。我々は、これまでタイ肝吸虫を感染させたハムスターの肝内胆管上皮細胞で 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の生成を認め(10, 11)、抗寄生虫薬投与により消失することを明らかにした(12)。また、タイ肝吸虫感染者を対象とした研究では、尿中の 8-oxodG 量が健常者、タイ肝吸虫感染者、胆管癌患者の順に有意に増加し、発がんリスク評価に応用出来る可能性を示した(13)。

本研究では、タイ肝吸虫と発がん物質の *N*-ニトロソジメチルアミンをハムスターに経口投与した発がんモデル動物を作成し、肝内胆管細胞における DNA 損傷塩基およびその生成に関連する分子の発現について免疫組織染色法により解析した。その結果、組織の線維化に関わるマトリクスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)の発現を介して iNOS 発現および 8-ニトログアニン生成をもたらす新しい分子機構を発見した(14)。さらに、この動物モデルに抗酸化剤クルクミンを含有する飼料を摂取させると、肝組織における炎症と 8-ニトログアニンなどの DNA 損傷塩基の生成を効果的に抑制し、がんの発生率を有意に減少させるという極めて興味深い知見を明らかにした(15)。さらにクルクミンは、活性酸素・窒素種の生成の抑制に加えて、細胞死の誘導および細胞増殖の抑制などに関わる多様なシグナル伝達機構を活性化させて発がん抑制作用を示すことを明らかにした(16)。以上の結果から、抗酸化剤の投与は、寄生虫感染を含む種々の環境要因による炎症関連発がんの予防に対して有効性を示すことが期待される。

7 まとめ

我々はこれまで、感染症、炎症性疾患および物理化学的因子などの種々の原因において、いずれの場合も発がん部位に酸化・ニトロ化 DNA 損傷塩基を生成し、慢性炎症から発がん

に至る過程を反映することを明らかにした。
これらの結果は、DNA 損傷塩基、特に 8-ニ
トログアニンが炎症関連発がんのリスクを評価
するバイオマーカーとして応用可能であるこ
とを示している。

また、ヒト肺組織を用いたアスベストに関
連する研究において、8-ニトログアニンの生
成量が発がん性の強い角閃石系石綿量と有意
に相関するという結果は極めて興味深い。し
たがって、8-ニトログアニンが環境発がん因
子への曝露量を評価するバイオマーカーとし
ても応用出来る可能性が考えられる。本研究
の成果を基盤として、炎症関連発がんの分子
機構をより詳細に解析することにより、種々
の環境因子による発がんのリスク評価法およ
び有効な予防法の開発につながる可能性が期
待できる。

8 謝辞

本稿の内容は、独立行政法人 国立がん研
究センターの委託を受けて実施した「がん研
究開発費事業」の研究課題「環境化学発がん
物質の曝露評価法の開発と発がんリスク評価
に関する研究」(主任研究者 静岡県立大学
大島寛史教授)の分担課題「環境因子による酸
化・ニトロ化 DNA 損傷の解析および発がんリ
スク評価への応用」における平成 22 年度の成
果によるものである。

本研究の遂行にあたり、共同研究者の先生
方、抗体作成法と免疫組織・細胞染色法をご
指導下さいました馬 寧先生(鈴鹿医療科学
大学保健衛生学部教授)、これまでご指導を賜
りました川西正祐先生(鈴鹿医療科学大学薬
学部・教授、三重大学名誉教授)および村田
真理子先生(三重大学大学院医学系研究科教
授)に深く感謝申し上げます。

9 参考文献

- 1) Hussain S. P. and C. C. Harris, Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer*, 121:2373-2380(2007).
- 2) IARC, Chronic infections, Stewart B. W. and P. Kleihues (eds.), *World Cancer Report*, pp.56-61, IARC Press, Lyon (2003).
- 3) Yermilov V., J. Rubio, M. Becchi, M. D. Friesen, B. Pignatelli and H. Ohshima, Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxyxynitrite in vitro, *Carcinogenesis*, 16:2045-2050(1995).
- 4) Hiraku Y. and S. Kawanishi, Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis, *Methods Mol. Biol.*, 512:3-13(2009).
- 5) Hiraku Y. and S. Kawanishi, Prognostic significance of nitrative DNA damage in infection- and inflammation-related carcinogenesis, Bonavida B. (ed.), *Nitric Oxide and Cancer: Prognosis, Prevention and Therapy*, pp.341-360, Springer, New York (2010).
- 6) Hiraku Y., Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance, *Environ. Health Prev. Med.*, 15:63-72(2010).
- 7) Hiraku Y., S. Kawanishi, T. Ichinose and M. Murata, The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1203:15-22(2010).
- 8) IARC, Carbon black, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 93, pp.43-191, IARC Press, Lyon (2010).
- 9) Takagi A., A. Hirose, T. Nishimura, N. Fukumori, A. Ogata, N. Ohashi, S. Kitajima and J. Kanno, Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, *J. Toxicol. Sci.*, 33:105-116(2008).
- 10) Pinlaor S., Y. Hiraku, N. Ma, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripan, P. Sithithaworn and S.

- Kawanishi, Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis, Nitric Oxide, 11:175-183(2004).
- 11) Pinlaor S., N. Ma, Y. Hiraku, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripana, P. Sithithaworn and S. Kawanishi, Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase, Carcinogenesis, 25:1535-1542(2004).
- 12) Pinlaor S., Y. Hiraku, P. Yongvanit, S. Tada-Oikawa, N. Ma, P. Pinlaor, P. Sithithaworn, B. Sripana, M. Murata, S. Oikawa and S. Kawanishi, iNOS-dependent DNA damage via NF- κ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel, Int. J. Cancer, 119:1067-1072(2006).
- 13) Thanan R., M. Murata, S. Pinlaor, P. Sithithaworn, N. Khuntikeo, W. Tangkanakul, Y. Hiraku, S. Oikawa, P. Yongvanit and S. Kawanishi, Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis, Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev., 17:518-524(2008).
- 14) Prakobwong S., P. Yongvanit, Y. Hiraku, C. Pairojkul, P. Sithithaworn, P. Pinlaor and S. Pinlaor, Involvement of MMP-9 in peribiliary fibrosis and cholangiocarcinogenesis via Rac1-dependent DNA damage in a hamster model, Int. J. Cancer, 127:2576-2587(2010).
- 15) Prakobwong S., J. Khoontawad, P. Yongvanit, C. Pairojkul, Y. Hiraku, P. Sithithaworn, P. Pinlaor, B. B. Aggarwal and S. Pinlaor, Curcumin decreases cholangiocarcinogenesis in hamsters by suppressing inflammation-mediated molecular events related to multistep carcinogenesis, Int. J. Cancer, 129:88-100(2011).
- 16) Prakobwong S., S. C. Gupta, J. H. Kim, B. Sung, P. Pinlaor, Y. Hiraku, S. Wongkham, B. Sripana, S. Pinlaor and B. B. Aggarwal, Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways, Carcinogenesis, 32:1372-1380(2011).