

繊維・粒子状物質によるニトロ化DNA損傷とリスク評価

Nitrative DNA damage induced by fibrous and particulate materials and risk assessment

平工 雄介
Yusuke Hiraku

キーワード

繊維・粒子状物質、炎症、活性酸素種、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。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や炎症性疾患(炎症性腸疾患など)に加えて、物理化学的因子(石綿、紫外線など)によっても惹起される。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)。しかし、炎症関連発がんの分子機構には現在でも不明な点が多い。

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)を損傷し、酸化 DNA 損傷塩基の 8-オキシデオキシグアノシン(8-oxodG)やニトロ化 DNA 損傷塩基の 8-ニトログアニン(8-nitroG)などが生成される。その結果、がん関連遺伝子などにおける突然変異をもたらし、発がんに関与すると考えられる(図 1)。活性酸素種は炎症のみならず、環境化学物質やミトコンドリアの電子伝達系など多様な産生源を有するのに対し、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。

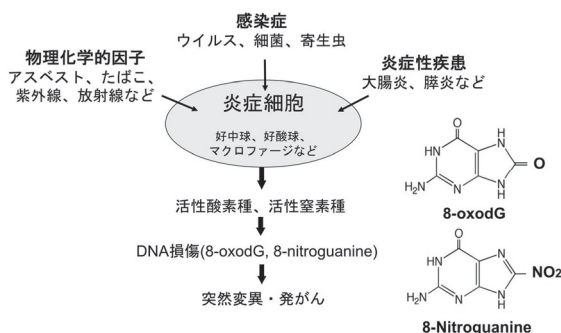


図 1 炎症条件下における酸化・ニトロ化 DNA 損傷塩基の生成

炎症条件下では、炎症細胞などから一酸化窒素(NO)とスーパーオキシド(O₂•)が産生され、両者の相互作用によりペロキシナイトライト(ONOO•)が生じ、DNA 塩基のグアニン(G)と反応して 8-nitroG が生成される(2)。DNA 中で生成された 8-nitroG 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。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)に代わりアデニン(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。したがって、8-nitroG は変異誘発性 DNA 損傷塩基と考えられる。

我々は、生体内の 8-nitroG 生成を炎症関連発がんの共通の分子機構として注目し、種々の臨床検体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きた。実験には、独自に作成したウサギポリクローナル抗 8-nitroG 抗体を用いた(3)。その結果、8-nitroG が炎症関連がんの発生および進展に関わることを明らかにしてきた(4-6)。

本稿では、繊維・粒子状物質による DNA 損傷に関連して、a) ヒト肺組織を用いた石綿(アスベスト)繊維量と DNA 損傷の強さとの関連の解析、および b) ナノ素材であるカーボンナノチューブ(CNT)によるヒト肺胞上皮培養細胞における 8-nitroG 生成に関する研究成果について述べる。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。

2 ヒト肺組織における石綿繊維量と DNA 損傷との関連

石綿とは、天然に存在する繊維状の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。石綿は、耐熱性、耐摩耗性などに優れるという理由で建設業などの幅広い業種で使用されてきた。しかし、我が国では最近、石綿曝露を受けた労働者のみならず、近隣住民に悪性中皮腫や肺がんなどの健康障害が多発する事例が発生している(7)。また、我が国での悪性中皮腫による死亡数は増加し続けており、将来もさらなる増加が懸念されている(8)。石綿は吸入曝露により呼吸器で慢性炎症を惹起し、発がんに関与すると考えられるが、その分子機構は解明されていない。また、曝露評価や疾病のリスク評価に資する指標は確立されていない。

我々は最近、動物実験でマウスにクリソタイルを気管内投与した場合に比べて、より発がん性の強い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ことを報告している(6)。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である。したがって、石綿による炎症反応に起因する活性酸素・窒素種に加えて、特にクロシドライトなど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 損傷を起し、強い発がん性を発揮する可能性が考えられる。

今年度は、ヒト肺組織における DNA 損傷塩基(8-nitroG および 8-oxodG)の生成について検討し、石綿繊維量との関連を解析した。我々は、悪性中皮腫患者(n=15)および非石綿関連疾患患者(石綿関連疾患、すなわち肺癌、悪性中皮腫、石綿肺の患者を除外、n=19)の肺組織の剖検・手術標本を得て、パラフィン切片を作成した。組織中の DNA 損傷塩基の生成については免疫組織染色法を行い、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各個人の染色強度とした。組織中の石綿繊維[クリソタイルおよび角閃石系石綿(クロシドライト、アモサイトなどを含む)]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数を計数した。石綿繊維量は対数正規分布を示したため対数変換を行い、DNA 損傷の染色性との相関を統計学的に解析した。

8-nitroG および 8-oxodG の生成は、肺組織の気道および肺胞上皮細胞や炎症細胞の核で認められた。肺組織中の石綿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($p < 0.01$, Student's *t*-test)。非常に興味深いことに、非石綿関連疾患群では、肺組織における 8-nitroG の染色強度が角閃石系石綿量と有意に相関した($p < 0.05$, Pearson's correlation)。しかし、クリソタイルの量とは相関を認めなかった。8-oxodG の染色強度は石綿繊維量と相関を認めなかったが、年齢と有意に相関した($p < 0.05$, Pearson's correlation)。悪性中皮腫群では 8-nitroG および 8-oxodG の染色強度と石綿繊維量との相関を認めなかった。以上の結

果から、8-nitroG は、特に石綿関連疾患を発症する前の過程において、石綿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示唆された。本研究は、肺組織での石綿繊維量と DNA 損傷性との関連を初めて定量的に明らかにした研究である。

3 カーボンナノチューブによる細胞内 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。ナノ素材は近年、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。カーボンナノチューブ(CNT)は機械的強度が高く、耐熱性、熱伝導性、電気伝導性に優れるなど、独特の物理化学的特性を有することから、新規材料としての応用が期待されている。しかし、実験動物への CNT の腹腔内投与により中皮腫を起こすことが最近報告されている(9, 10)。ナノ素材は吸入すると肺組織で慢性炎症を惹起し、発がんや組織の線維化をもたらす可能性が考えられる。CNT は石綿と同様、繊維状の形状を示すことから、ヒトへの健康影響が懸念されている。

本研究では、多層 CNT (MWCNT)による DNA 損傷について、ヒト肺胞上皮由来の培養細胞を用いて解析した。MWCNT は凝集しやすいため、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、遠心により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 MWCNT を含む上清をヒト肺胞上皮由来の A549 細胞に添加して一定時間培養し、免疫細胞染色法により 8-nitroG 生成について解析した。その結果、MWCNT は濃度依存的に細胞核で 8-nitroG を生成した(図 2)。染色性の強さを定量的に画像解析した結果、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で対照より有意に強く 8-nitroG が生成された($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test)。

MWCNT による 8-nitroG 生成は、iNOS 阻害剤、NF- κB 阻害剤、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の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、大部分の MWCNT が細胞質内のリソソーム様小胞に存在する像を認めたが、一部は核内に到達している像も認められた。以上の結果から、MWCNT は貪食能を有しない肺上皮細胞でもエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ、活性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(11)。細胞内の粒子が活性窒素種産生などの炎症反応をもたらす分子機構については、現在さらに検討を進めている。

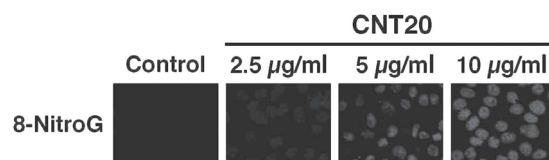


図 2 MWCNT による細胞内 8-nitroG 生成
A549 細胞を直径 20-30nm、長さ 0.5-2 μm の MWCNT(CNT20)で 37°C、4 時間処理して免疫細胞染色を行い、8-nitroG を検出した。

4 まとめ

我々はこれまで、感染症、炎症性疾患、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 8-nitroG が生成され、炎症関連がんの発生や進展に至る過程に関与することを明らかにしてきた。今年度は、ヒト肺組織を用いた研究において、石綿関連疾患が発症していない条件下では、8-nitroG の生成量が角閃石系石綿量と有意に相関するという極めて興味深い結果を得た。したがって、8-nitroG は繊維・粒子状物質への曝露量を評価する指標として応用出来る可能性が考えられる。また、MWCNT で曝露した肺上皮由来の培養細胞で 8-nitroG の生成を認めたことから、8-nitroG はナノ素材の遺伝毒性の評価指標と

して応用出来る可能性も考えられる。

5 謝辞

本稿の内容は、独立行政法人 静岡県公立大学法人 静岡県立大学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 23 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長・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。

6 参考文献

1. Hussain S. P., C. C. Harris: Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer*, 121:2373-2380 (2007)
2. Yermilov V., J. Rubio, M. Becchi, M. D. Friesen, B. Pignatelli, H. Ohshima: Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite *in vitro*, *Carcinogenesis*, 16:2045-2050 (1995)
3. Hiraku Y., S. Kawanishi: Immunohistochemical analysis of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in relation to inflammation-associated carcinogenesis, *Methods Mol. Biol.*, 512:3-13 (2009)
4. Hiraku Y., S. Kawanishi: Prognostic significance of nitrative DNA damage in infection- and inflammation-related carcinogenesis, In: *Nitric oxide and cancer: Prognosis, prevention and therapy*, Springer, 341-360 (2010)
5. 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)
6. Hiraku Y., S. Kawanishi, T. Ichinose, M. Murata: The role of inos-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1203:15-22 (2010)
7. Kurumatani N., S. Kumagai: Mapping the risk of mesothelioma due to neighborhood asbestos exposure, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 178:624-629 (2008)
8. Robinson B. W., R. A. Lake: Advances in malignant mesothelioma, *N. Engl. J. Med.*, 353:1591-1603 (2005)
9. Takagi A., A. Hirose, T. Nishimura, N. Fukumori, A. Ogata, N. Ohashi, S. Kitajima, J. Kanno: Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, *J. Toxicol. Sci.*, 33:105-116 (2008)
10. Nagai H., Y. Okazaki, S. H. Chew, N. Misawa, Y. Yamashita, S. Akatsuka, T. Ishihara, K. Yamashita, Y. Yoshikawa, H. Yasui, L. Jiang, H. Ohara, T. Takahashi, G. Ichihara, K. Kostarelos, Y. Miyata, H. Shinohara, S. Toyokuni: Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:E1330-1338 (2011)
11. Guo F., N. Ma, Y. Horibe, S. Kawanishi, M. Murata, Y. Hiraku: Nitrative DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 260:183-192 (2012)