

25-A-5 胆管癌等の職業性発がんの原因解明と発がんリスク評価に資するバイオマーカーの開発
戸塚 ゆかり (国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・発がん・予防研究分野)

研究の分類・属性

発がん・がん生物学

研究の概要

本研究では、化学物質への高濃度曝露により発症する「職業がん」の原因の探索と発がんリスク評価に資するバイオマーカーの探索を行なう。

1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明に関する研究

印刷業に携わる従業員に胆管がんが多発していることが話題となっており、印刷業で使用される化学物質（ジクロロメタン(DCM)や1,2-ジクロロプロパン(DCP)）への慢性的な大量曝露が、これら胆管がんの発症要因となっていることが疑われているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業者で多発するヒト胆管がんとの関係は未だ良くわかっていない。

印刷業従事者の胆管癌 4 例の FFPE 検体の全エクソン解析を行ったところ、既知の胆管癌関連遺伝子を含む 1,451±1,089 ヶ所のアミノ酸変異を伴う体細胞変異が検出された。この数はこれまで文献報告された肝吸虫関連胆管癌をはじめとする肝胆道系悪性腫瘍における体細胞変異にくらべて極めて高頻度であった（論文投稿中）。塩基置換のプロファイルにおいては、C:G から T:A へのトランジションが約 40~60%を占めていた。ゲノム解析のデータから、変異塩基とその両隣の 3 塩基について変異の発生頻度を解析すると、通常の胆管癌には観察されない、GpCpPy->GpTpPy に変異が多く検出され、特異的なシグネチャーを示すことが明らかとなった。また、それら変異はアンチセンス鎖に多く検出されており、通常の胆管癌には観察されなかった strand bias が観察されることもわかった。一方、通常型胆道がんにおける特徴的な signature の解析を行った結果、肝内胆管癌は、肝外胆管癌や胆嚢癌とは異なる CpG->TG 置換が優勢な加齢型置換パターンが多かったが、それに加え C->G/C->T 置換優位な APOBEC 経路による置換パターンも観察された。これらの 2 つの signature には strand bias が観察されず、特定の DNA 付加体による変異よりは DNA 修復系の異常が原因であると推測された。また一部の胆道癌では hypermutation を示すグループが見られたが、こうした症例を抽出して解析を行っても、印刷業関連胆管癌とは異なり CpG->TG 置換が優位であった。さらに、*Salmonella typhimurium* TA100 を用いて DCM および DCP のグローバルな変異解析を目的に、DCM および DCP で処理した *S. typhimurium* TA100 の全ゲノム解析を行なった。DCM および DCP で処理した *S. typhimurium* TA100 (DCM: 47 クローン、DCP: 96 クローン)の全ゲノム解析を行ったところ、観察された変異プロファイルは、DCM では C:G->A:T および C:G->T:A がほぼ同程度であったのに対して、DCP では C:G to T:A が主要であった。さらに、変異シグネチャー解析を行なったところ、DCP による変異シグネチャーが印刷業従事者の胆管癌に観察された特異的なシグネチャーと一部が一致することがわかった。このことから、DCP の曝露が職業性胆管癌発症の一部に関与することが示唆された。一方、ヒト胆管癌より樹立した細胞株に DCM および DCP を単回または複数回曝露させ、全エクソン解析によるグローバルな変異解析についても検討した。その結果、印刷業従事者に観察された変異スペクトラムと同様に C:G->T:A および C:G->A:T 変異が優位であったものの、DCM 及び DCP 曝露により胆管癌細胞に観察された塩基置換のシグネチャーは、印刷業従事者に認められたシグネチャーを完全に再現することはなかった。このことから (1)DCP, DCM が宿主特異的な代謝機構により変化する可能性、(2)宿主体内における免疫応答などの微小環境が変異を修飾し発がんに寄与する可能性などを引き続き検討する必要があると思われた。

2) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノ材料に由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索に関する研究

アスベストの曝露と中皮腫の発生は密接な関係があることがわかっているが、実際の腫瘍発生までは 30~40 年と非常に長い期間を要することから、有用な発がん予測および早期診断マーカーの開発が望まれている。また、近年、化粧品や医薬品等にナノ材料が多用され、ヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。中で

も、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は形状がアスベストと類似しており、実験動物に中皮腫を誘発することが報告されており、MWCNTの発がんリスク評価に資するバイオマーカーの開発が必要である。そこで、本研究では、アスベストおよびMWCNT投与により実験動物に誘発した中皮腫および肺がん発症動物モデルを用いて、診断マーカー検索を行なうことを目標とする。動物モデルから得られた中皮腫検体並びに正常中皮細胞を用いて、全エクソームまたは全ゲノム、及び全転写産物解析を行い、融合遺伝子や遺伝子発現異常、特徴的な遺伝子変異の解析や塩基置換プロファイル等について検索を行なう。候補遺伝子等が明らかになってきたときには、ヒトサンプルで検証し、その生物学的な意義を追究する予定である。更に、多層カーボンナノチューブ投与による悪性中皮腫に関しても同様に解析を行う予定である。

平成 27 年度研究経費

8,978 千円

研究班の組織

第3年次

研究者名	所属研究機関名・職名	分担する研究課題名・項目
戸塚ゆ加里	国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野・エリート長	職業性胆管がん候補原因物質が誘発する遺伝子変異の解析および曝露評価 アスベストおよび多層カーボンナノチューブが誘発する遺伝子変異の解析および曝露評価
柴田 龍弘	国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 疾病ゲノムセンター がんゲノミクス研究分野・分野長	高速シーケンサーを用いた胆管がんにおける遺伝子変異検索
土原一哉	国立研究開発法人 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター トランスレーショナルリサーチ・分野長	高速シーケンサーを用いた胆管がんにおける遺伝子変異検索
中森正二	国立病院機構大阪医療センター・ 副院長	胆管がん組織の収集と臨床データの解析
落合淳志	国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所・ 副所長	胆管がんの病理学的検索
豊國伸哉	名古屋大学大学院医学系研究科 病理病態学講座生体反応病理学・分子病理診断学・ 教授	アスベスト繊維や多層カーボンナノチューブによる動物中皮腫モデルの解析

全期間

(目的と到達目標)

- 1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明
印刷業従事者を含む若年発症の胆管癌 FFPE 検体の遺伝子変異解析を行い、通常胆管がんの遺伝子変異データと比較することで、職業性胆管がんに特徴的な遺伝子変異のパターンを見出し、*in vitro*および*in vivo*における発がん物質誘導変異プロファイルとの関連から印刷業従事者において多発する胆管がんの原因物質を探索する。
- 2) 胆管癌原因候補化学物質への曝露状況の把握並びに発がんリスク評価に有用なバイオマーカーの探索
胆管癌原因候補物質への曝露状況の把握に有用なバイオマーカーの探索および、これら化学物質の代謝に係る酵素の多型を胆管がん発症予測へ応用することの妥当性について検討する。
- 3) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノ材料に由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索
アスベストおよびMWCNT 投与により実験動物に誘発した中皮腫および肺がん発症動物モデルを用いて、診断マーカー探索を行なうことを目標とする。
動物モデルから得られた中皮腫検体並びに正常中皮細胞を用いて、全エクソームまたは全ゲノム、及び全転写産物解析を行い、融合遺伝子や遺伝子発現異常、特徴的な遺伝子変異の解析や塩基置換プロファイル等について探索を行なう。候補遺伝子等が明らかになってきたときには、ヒトサンプルで検証し、その生物学的な意義を追究する予定である。更に、多層カーボンナノチューブ投与による悪性中皮腫に関しても同様に解析を行う予定である。

(第3年次評価時点の実績要点)

- 1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明
通常型胆管がんについて大規模な遺伝子変異データを元に、変異シグネチャー解析を行った。その結果、C>T at CpG 置換に加えて、C>U RNA 編集酵素である APOBEC 遺伝子によって導入される変異シグネチャーを主要なシグネチャーとして同定した。一方、印刷業従事者を含む若年発症の胆管癌 FFPE 検体の遺伝子変異解析についても行い、通常胆管がんの遺伝子変異データと比較することで、職業性胆管がんの特徴的な遺伝子変異のパターンを見出した。更に、*in vitro*における発がん物質誘導変異プロファイルとの関連から印刷業従事者において多発する胆管がんの原因物質を探索することを達成した。
- 2) 胆管癌原因候補化学物質への曝露状況の把握並びに発がんリスク評価に有用なバイオマーカーの探索
DCM 及び DCP の遺伝毒性発現に対する代謝酵素 (GSTT1) の影響について、*in vitro* の系を用いて検討を行ったところ、GSTT1 は DCM の代謝活性化には寄与するものの、DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。一方、DNA 付加体の網羅的解析手法を用いて、DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、[M+H: 430.23]の DNA 付加体が DCP 曝露に特徴的なものとしてスクリーニングされた。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。
- 3) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノ材料に由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索
アスベスト誘発ラット中皮腫モデルにおいて、予後のよい上皮型と予後の悪い肉腫型の検体を使用することにより発現差のある遺伝子の解析を行った。その結果、Connective tissue growth factor (CTGF; CCN2)をその主要な責任遺伝子として選出した。CTGF は中皮腫細胞の悪性度の維持に重要であり、上皮型から肉腫型への形態変化に関与した。また、分泌され、その後自らの LRP6 受容体を介してβカテニンプロモーター複合体を活性化し、その制御下にある CTGF を増産するという autocrine loop を形成することが判明した。さらに、CTGF は血清へも分泌され、その高値は予後と逆相関した。ヒト血清の濃度を検討すると、二相性中皮腫の中に血清 CTGF の高い症例が存在することを確認した。
アスベスト誘発ラット中皮腫モデルの腫瘍サンプルを使用して、次世代シーケンサーを使用して RNA-seq 解析を行い、新奇の融合遺伝子候補を多数得ることができた。さらに、RNA-seq のデータから遺伝子変異解析、遺伝子発現解析を行い、責任遺伝子の候補を追加した。

アスベストおよび多層カーボンナノチューブ(MWCNT)投与により実験動物に誘発した中皮腫および肺がんの全エクソーム解析については現在解析途中である。

第3年次

(到達目標)

- 1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明に関する研究
これまでの研究により得られた結果の妥当性を明らかにするために、さらに別症例の職業性胆管癌症例の解析を追加するとともに、国立がん研究センターにおいて治療された過去の症例を探索し、若年発症、胆管の硬化所見など印刷業従事者に発症した胆管癌と臨床病理学的背景が類似したものを探索して同様に全エクソーム解析を行う。
引き続きバクテリアを用いて DCM および DCP の変異シグネチャー解析をおこなうとともに、哺乳動物細胞株やヒト胆管癌細胞株等を用いて、DCM、DCP より誘発されるグローバルな変異の解析について検討する。
- 2) 胆管癌原因候補化学物質への曝露状況の把握並びに発がんリスク評価に有用なバイオマーカーの探索
DCM 及び DCP の遺伝毒性発現に対する代謝酵素 (GSTT1, CYP2E1) の影響について、*in vitro* の系を用いて検討する。一番、遺伝毒性の発現を増強させる条件を見出し、この条件下にて DCM 及び DCP に由来する付加体の探索を行なう。DCM および DCP に由来する付加体が同定できた場合は、印刷業従事者の生体試料中にこれら付加体が存在するかどうかについて検討する。
- 3) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノ材料に由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索に関する研究
ヒトにおいても CTGF を高発現し、血清に分泌する悪性中皮腫が存在するのかどうかを検討する。
多数の融合遺伝子候補の中から生物学的意義を有するものを見だし、可能ならヒトの検体で同様の変化があるかどうかを検討する予定である。
また、動物モデルから得られた中皮腫検体並びに正常中皮細胞を用いて、全エクソームまたは全ゲノム解析を行い、マーカーとなり得る特徴的な遺伝子変異の解析や塩基置換プロファイル等について検索を行なう。

(年次評価時点の実績要点)

- 1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明に関する研究
 - 印刷業従事者のゲノム解析
国立がん研究センター東病院で切除された若年発症例の網羅的変異解析データを入手し、前年度までに得られた印刷業従事者に発症した肝内胆管がんのゲノムプロファイルとの異同を明らかにした。また、大阪市以外の事業所での発症例、切除肝の広範囲にわたる詳細な病理組織像との対照により多クローン発がんの解析が可能な症例の網羅的変異プロファイルを解析中である。一方、通常型胆管がんについて大規模な遺伝子変異データを元に、変異シグネチャー解析を行った。その結果、C>T at CpG 置換に加えて、C>U RNA 編集酵素である APOBEC 遺伝子によって導入される変異シグネチャーを主要なシグネチャーとして同定した。
 - 培養細胞を用いた胆管癌原因候補物質の変異プロファイルの解析
昨年に続き、*Salmonella typhimurium* TA100 を用いて候補化学物質のグローバルな変異解析を行なった。DCM および DCP で曝露した TA100 (DCM: 47 クローン、DCP: 96 クローン) の全ゲノム解析を行ったところ、検出された変異総数は DCM および DCP 曝露により増加した。変異プロファイルは、DCM では C:G→A:T および C:G→T:A がほぼ同程度であったのに対して、DCP では C:G to T:A が主要であった。さらに、変異シグネチャー解析を行なったところ、DCP による変異シグネチャーが印刷業従事者の胆管癌に観察された特異的なシグネチャーと一部が一致することがわかった。
- 2) 胆管癌原因候補化学物質への曝露状況の把握並びに発がんリスク評価に有用なバイオマーカーの探索
DCM および DCP の代謝活性化に寄与すると考えられている GST-T1 の変異原性およびスペクトラムへの影響について検討するため、ヒト GST-T1 を強制発現させた *S. typhimurium* TA100 を作成した。この菌株を用いて DCM および DCP の変異原性を調べた結果、野生型と比べ DCM では復帰変異コロニー数の上昇が観察されたが、DCP では観察されなかった。このことから、DCP の変異原性発現には GST-T1 は寄与しないことが推測された。

一方、DNA 付加体の網羅的解析手法を用いて、DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、[M+H: 430.23] の DNA 付加体が DCP 曝露に特徴的なものとしてスクリーニングされた。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。

3) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノマテリアルに由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索に関する研究

アスベスト誘発ラット中皮腫モデルを用いた昨年までの成果において、予後を規定する責任遺伝子として、Connective tissue growth factor (CTGF; CCN2)を見いだした。ヒトの悪性中皮腫においても血清 CTGF の検討を行い、CTGF 高値を呈する症例が存在することを確認した。また、融合遺伝子の FGFR2-TACC fusion に注目して、ラットの悪性中皮腫細胞株ならびに腫瘍とヒト悪性中皮腫の細胞株で解析を行った。さらに、ラット悪性中皮腫のアレイ CGH 解析を元に、原因となったアスベストを推定するプログラムの作成や幹細胞マーカーとして注目される CD44v の探索をヒト悪性中皮腫培養細胞で検討した。

アスベストおよびMWCNT 投与により実験動物に誘発した中皮腫および肺がんの全エクソーム解析については解析中である。

研究成果と考察

第3年次評価時点

1) 印刷業従事者にみられる胆管がん発症の原因究明に関する研究

● 印刷業従事者のゲノム解析

若年発症胆管癌臨床検体の網羅的ゲノム解析が次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラムがん臨床シーズ育成領域の研究課題として採択され、診断、治療シーズの探索目的に印刷業従事者にみられる胆管がんの網羅的ゲノム解析を実施している。ここで得られたゲノムデータを用い、発がんプロセスに関連する解析を本研究班で実施している。(1) これまでの大阪市内の一事業所における発症例に加え、大阪市以外の事業所で DCP, DCM に曝露歴があり胆管癌を発症し労災認定された 1 症例の外科切除標本を入手し全エクソーム解析を実施している。前年度までに明らかにした大阪市の発症例と同様の体細胞変異プロファイルが再現されれば同一の化合物による発がんメカニズムを強く示唆するものとなる。(2) 印刷業従事者に見られる胆管がん切除標本に広範囲に異型細胞が観察されることから、大阪市の発症例で前年度までに主病変のうち、切除標本全体にわたる詳細な病理組織学的な検索が行われている 1 例について占拠部位が異なる 5 ヶ所を選び全エクソームシーケンスを行っている。多クローン性発がんの有無と異なるクローン間で同一の体細胞変異プロファイルが認められるかの検討、背景の組織障害の程度と変異発生の相関の検討などを行い、より詳細な発がん過程を明らかにする。(3) 国立がん研究センター東病院で外科切除された 50 歳以下の胆管がん 2 例および胆嚢がん 1 例の全エクソーム解析を行った。胆道がんでは珍しい若年発症例であったが、変異のプロファイルは前年度までに解析した高齢発症の胆管がんや、今年論文報告があった本邦の胆道癌のそれと類似しており、印刷業従事者にみられる胆管がんにおける変異プロファイルとは、変異頻度、3 塩基置換パターンとも異なっていた。(4) 260 例の通常型胆道がんを対象として、全エクソーム解読を行い、得られた体細胞変異 (塩基置換) をその前後の配列を含めた 96 パターンに分類し、Non-negative matrix factorization の手法を用いて、変異シグネチャーを抽出した。その結果、多くのがんで共通して認められる C>T at CpG (COSMIC signature 1) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signature>)並びに C->G/C->T 置換優位な APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) 遺伝子によって導入される変異シグネチャー (COSMIC signature 13) が同定できた。DNA 修復酵素異常などの要因により高度変異蓄積を伴う症例では COSMIC Signature 1 が優勢であった。一方 COSMIC signature 13 は、肝外胆管がん優位に認められ、またその貢献度は APOBEC3B 遺伝子の発現量と有意な相関 ($r = 0.268, P = 0.00162$) を認めた。

本研究で解析された印刷業関連胆管癌は変異数が多いものの、通常型で見られる signature1, 13 とは異なった置換パターンを示し、この新規 signature は、若年者、肝炎ウイルス感染例や DNA ミスマッチ酵素異常症例、並びに海外の肝吸虫関連の胆管がん変異データでは検出できなかったことから、特殊な要因に由来するものである可能性を強く示唆する。

- **培養細胞を用いた胆管癌原因候補物質の変異プロファイルの解析**

Salmonella typhimurium TA100 を用いて DCM および DCP のグローバルな変異解析を行った。DCM および DCP で処理した *S. typhimurium* TA100 (DCM: 47 クローン、DCP: 95 クローン) の全ゲノム解析を行ったところ、検出された変異総数は被験物質非曝露群に比べ DCM および DCP 曝露により増加した。観察された変異プロファイルは、DCM では C:G to A:T および C:G to T:A がほぼ同程度であったのに対して、DCP では C:G to T:A が主要であった。さらに、変異シグネチャー解析を行なったところ、DCP による変異シグネチャーが印刷業従事者の胆管癌に観察された特異的なシグネチャーと一部が一致 DCM による変異シグネチャーは臨床サンプルと異なるパターンを示すことがわかった。このことから、DCP の曝露が職業性胆管癌発症の一部に関与することが示唆された。一方、ヒト胆管癌より樹立した細胞株に DCM および DCP を単回または複数回曝露させ、全エクソン解析によるグローバルな変異解析についても検討した。その結果、印刷業従事者に観察された変異スペクトラムと同様に C:G→T:A および C:G→A:T 変異が優位であったものの、DCM 及び DCP 曝露により胆管癌細胞に観察された塩基置換のシグネチャーは、印刷業従事者に認められたシグネチャーを完全に再現することはなかった。このことから (1) DCP, DCM が宿主特異的な代謝機構により変化する可能性、(2) 宿主体内における免疫応答などの微小環境が変異を修飾し発がんに寄与する可能性などを引き続き検討する必要があると思われた。

- **胆管がんの病理学的特徴**

ヒト胆管がん症例について、GST-T1 および AID の染色を行い、前がん病変と考えられている Bi1 IN 病変に強く発現し、浸潤がんになると減少することを明らかにしてきた。今年度は新たに、東京ならびに大阪に発症した印刷工胆管がん症例について検討し、同様な結果を確認した。印刷工に起こる胆管がんの病理学的特徴として、極めて多数の変異と背景の炎症が特徴であることを病理学的に明らかにしてきた。現在、遺伝子変異数の多い MSI 陽性大腸癌症例やリンパ球浸潤の多い EB ウイルス感染胃癌などが免疫チェックポイント PDL-1 を標的とした治療に有効であることが、様々な臨床試験で明らかになってきていることより、再発した印刷従業者患者の胆道がんにおける PDL-1、GSTT-1 を染色し、陽性である事を確認した。

2) 胆管癌原因候補化学物質への曝露状況の把握並びに発がんリスク評価に有用なバイオマーカーの探索

DCM および DCP の代謝活性化に寄与すると考えられている GST-T1 の変異原活性およびスペクトラムへの影響について検討するため、ヒト GST-T1 を強制発現させた *S. typhimurium* TA100 (TA100-GST) を作成した。この菌株を用いて DCM および DCP の変異原性を調べた結果、野生型と比べ DCM では復帰変異コロニー数の上昇が観察されたが、DCP では観察されなかった。このことから、DCP の変異原性発現には GST-T1 は寄与しないことが推測された。また、DCM で処理した TA100-GST (43 クローン) の全ゲノム解析を行ない、グローバルな変異解析について検討したところ、野生型の変異パターンと比べ C:G to A:T 変異が増加することがわかった。DCM 等のハロゲン系炭化水素は GST T1-1 により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。したがって、DCM で処理した TA100-GST において N²-GSH-Me-dG、もしくは N²-GSH-Me-dC が形成され、C:G to A:T 変異を誘発している可能性が示唆された。一方、DCP に関しては変異原性発現に GST-T1 が寄与しないことが推測され、その付加体構造に関してはよくわかっていない。そこで、DNA 付加体の網羅的解析手法を用いて、DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、[M+H: 430.23] の DNA 付加体が DCP 曝露に特徴的なものとしてスクリーニングされた。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。

3) アスベストおよび多層カーボンナノチューブ等のナノマテリアルに由来する中皮腫および肺がん診断マーカーの探索に関する研究

昨年に引き続き、CTGF に関してヒト血清の濃度を検討すると、二相性中皮腫の中に血清 CTGF の高い症例が存在することを確認した。アスベスト誘発ラット中皮腫モデルの腫瘍サンプルを使用して、アレイ CGH の結果から原因となるアスベスト繊維の同定を行うプログラムの作成を、遺伝子発現差を根拠として試みた。次世代シーケンサーを使用して RNA-seq 解析を行い、新規の融合遺伝子候補を多数得ることができた。さらに、RNA-seq のデータから遺伝子変異解析、遺伝子発現解析を行い、責任遺伝子の候補を追加した。10 例のうち 1 例に存在した融合遺伝子の FGFR2-TACC fusion に注目して、ラットの悪性中皮腫細胞株ならびに腫瘍とヒト悪性中皮腫の細胞株で解析を行った。ラット 20 サンプルにおいて、3 例においてこの 2 遺伝子の融合を認めたが、キナーゼ部分を含んでいなかった。しかし、この 2 遺伝子が融合しやすいことは注目に値する。ヒト悪性中皮腫の 14 細胞株ではこの融合遺伝子は検出できなかった。ラット悪性中皮腫のアレイ CGH

解析を元に、原因となったアスベストを推定するプログラムの作成を試みた。幹細胞マーカーとして注目される CD44v の探索をヒト悪性中皮腫培養細胞で検討した。ヒト悪性中皮腫の細胞株で CD44v の高発現のものを確認したが、これまでの他の腫瘍における報告とは異なり酸化ストレスが増加しており、さらに検討を要する。また、中皮細胞のアスベスト取り込みには Annexin 2 が重要であることを発見し、好中球に関して多層カーボンナノチューブとアスベストでは反応が異なることを示した。

倫理面への配慮

遺伝子解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 16 年, 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に従い、個人情報保護を中心とした人権擁護に十分配慮して研究を行う。手術標本の残余組織の研究利用については、患者及び家族に対して説明し同意を得る。印刷業従事者における検体使用に関しては、各協力医療機関で個別同意を得た上で、連結可能匿名化された検体を当センターにて解析する。組織の採取にあたっては、病理組織学的診断を優先して行い、患者への不利益を生じさせない。患者のプライバシーは遵守する。必要に応じて各研究施設の倫理委員会の承諾を得るものとする。疫学研究については、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）を遵守する。又、動物実験は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び、各研究者の所属施設の実験動物取り扱い（倫理）規定を遵守して行い、実験に用いる動物についても統計学的検定に必要な最小限の個体数を用いることとする。尚、本研究におけるヒト胆管癌遺伝子変異解析は、既に国立がん研究センター倫理審査委員会により承認されている（17-30 主任研究者：柴田龍弘 研究課題：「ゲノム異常解析に基づく、肝がん、膵がん、肺がん、胃がん、大腸がん、胆道がん、乳がん、食道がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、頭頸部がん、骨軟部肉腫の発生・進展の分子機構の解明」および 2014-072 主任研究者：戸塚ゆ加里 研究課題：「胆管癌等の職業性発がんの原因解明とバイオマーカーの開発」）。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

第3年次

（雑誌論文）

・がん研究開発費による成果であることが記載されているもの

1. Toyokuni S, Jiang L, Kitaura R and Shinohara S. Minimal inflammogenicity of pristine single-wall carbon nanotubes. Nagoya J Med Sci. 77: 195-202, 2015.
2. Yamashita K, Nagai H and Toyokuni S. Receptor role of annexin A2 in the mesothelial endocytosis of crocidolite fibers. Lab Invest 95: 749-764, 2015.
3. Chew SH and Toyokuni S. Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: An update. Free Radic Biol Med 86: 166-178, 2015.
4. Toyokuni S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. Arch Biochem Biophys 595: 46-49 2016.
5. Wang Y, Okazaki Y, Shi L, Kohda H, Tanaka M, Taki K, Nishioka T, Hirayama T, Nagasawa H, Yamashita Y, Toyokuni S. Role of hemoglobin and transferrin in multi-wall carbon nanotube-induced mesothelial injury and carcinogenesis. Cancer Sci. 2016 Mar; 107(3):250-7. doi: 10.1111/cas.12865.
6. Toyokuni S. The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. Pathol Int. 2016 doi: 10.1111/pin.12396.
7. Jiang L, Chew SH, Nakamura K, Ohara Y, Akatsuka S and Toyokuni S. Dual preventive benefits of iron elimination by desferal in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis. Cancer Sci. 2016 doi: 10.1111/cas.12947.
8. Mimaki S, Totsuka Y, Shibata T, Tsuchihara K et al. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. Carcinogenesis (in press).

- がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの
 1. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T; Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet.* 2015 Sep; 47(9): 1003-10.
 2. Funahashi F, Okazaki Y, Ito D, Asakawa A, Nagai H, Tajima M and Toyokuni S. Asbestos and multi-walled carbon nanotubes generate distinct oxidative responses in inflammatory cells. *J Clin Biochem Nutr* 56: 111-117, 2015.
 3. Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int. J Mol Sci.* 2015, Feb 4; 16(2): 3474-92.
- その他 間接的ではあるが関連している論文
 1. Mori M, Ito F, Shi L, Wang Y, Ishida C, Hattori Y, Niwa M, Hirayama T, Nagasawa H, Iwase A, Kikkawa F, Toyokuni S. Ovarian endometriosis-associated stromal cells reveal persistently high affinity for iron. *Redox Biol.* 2015 Oct 21;6:578-586. doi: 10.1016/j.redox.2015.10.001.

(学会発表)

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉: 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明, 第 42 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月
2. Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiko Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月
3. 戸塚ゆ加里 : ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月
4. 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里 : 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響, 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月
5. 土原一哉 : 網羅的ゲノム解析よりあきらかになった印刷工場関連胆管癌遺伝子変異の特徴, フォーラム2015衛生薬学・環境トキシコロジー (2015年9月 神戸)
6. 三牧幸代、戸塚ゆ加里、落合淳志、久保正二、中森正二、中釜斉、江角浩安、土原一哉 : 印刷業従業者胆管癌のゲノム変異より明らかとなった変異原物質の特徴, 第74回日本癌学会学術集会 (2015年10月 名古屋)
7. Toyokuni S. Cancer as a ferrotoxic disease: what we have learned from animal experiments toward its prevention. Bosch Institute Annual Scientific and Young Investigator's Meeting. Canceromics: From Molecular and Cellular Biology to Breakthrough Therapeutics (University of Sydney, July 16-17, 2015; Sydney, Australia; invited, plenary speaker)
8. Toyokuni S, Mukaide T, Hattori Y, Ito F, Mori M, Ohara Y, Hirayama T, Nagasawa H. Novel fluorescent probe detecting catalytic ferrous iron. 6th meeting of the International BioIron Society (Zhejiang University, Hangzhou, China; September 6-10, 2015)
9. Toyokuni S, Shi L, Wang Y, Okazaki Y. Direct exposure of non-thermla plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet odifications in biomolecules: application to cancer therapy. The 10th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2015) (September 20-24, 2015; Jeju, Korea; invited speaker).
10. 豊國伸哉 宿題報告3 : 酸化ストレス病理学の確立とその疾患予防への展望 第 104 回日本病理学会総会 (2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋市熱田区)
11. 赤塚慎也、李 光華、川口真一、豊國伸哉 鉄ニトリロ三酢酸誘発腎発癌モデルにおける酸化的 DNA 損傷のゲノム内分布 第 104 回日本病理学会総会 (2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋市熱田区)
12. 李 光華、赤塚慎也、西山誉大、中別府雄作、豊國伸哉 Mutyh 欠損マウスにおける鉄ニトリロ三酢酸誘発腎がんの解析 第 104 回日本病理学会総会 (2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋市熱田区)
13. 神田 容、王 越、豊國伸哉 タンパク質を吸着することはカーボンナノチューブの中皮細胞毒性を増強させる 第 104 回日本病理学会総会 (2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋市熱田区)
14. 赤塚慎也、李 光華、川口真一、豊國伸哉 マウス腎発がん初期過程における酸 化的 DNA 損傷のゲノム内分布 第 22 回日本癌予防学会総会 (平成 27 年 6 月 5 日~6 日、ラフレさいたま、埼玉県さいたま市)

15. 蔣 麗、周 珊瑚、大原悠紀、王 申奇、赤塚慎也、岡崎泰昌、豊國伸哉 結合組織成長因子はラット肉腫型中皮腫においてβカテニンと活性化オートクラインループを形成する 第22回日本癌予防学会総会(平成27年6月5日~6日、ラフレさいたま、埼玉県さいたま市)
16. 岡崎泰昌、周 珊瑚、酒井晃太、Dilnur Aierken、王 越、永井裕崇、三澤伸明、神山宣彦、豊國伸哉 中皮細胞傷害と発がん性はトリモライトに強く、アンソフィライトに弱い 第68回日本酸化ストレス学会学術集会(平成27年6月11日~12日、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市)
17. 豊國伸哉 特別講演1:酸化ストレス病理学の確立とその疾患予防への展望 第68回日本酸化ストレス学会学術集会(平成27年6月11日~12日、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市)
18. 豊國伸哉 アスベストによる中皮腫発生機構 増加する悪性中皮腫のスキルアップを目指して-中皮腫細胞の機能と形態から診断のカギを探る- 第56回日本臨床細胞学会総会(春季大会)(平成27年6月12日~14日、くにびきメッセ/松江テルサ、島根県松江市、招待演者)
19. 豊國伸哉 アスベストによる中皮腫発がん機構の解明とナノマテリアルのリスク評価 シンポジウム4:ナノマテリアルの毒性評価のシンポ 第42回日本毒性学会学術集会(平成27年6月29日~7月1日、石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、石川県金沢市、招待演者)
20. 李 光華、赤塚慎也、二口 充、中別府雄作、豊國伸哉 Mutyh 欠損マウスにおける鉄ニトリロ三酢酸誘発腎発がんの解析 第30回発癌病理研究会(平成27年8月26日~28日、リゾートホテルオリビアン小豆島、香川県)
21. 岡崎泰昌、周 珊瑚、酒井晃太、Dilnur Arken、王 越、永井裕崇、三澤伸明、神山宣彦、豊國伸哉 中皮細胞傷害性と発がん性はトリモライトに強く、アンソフィライトに弱い第39回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会(平成27年8月29日~30日、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
22. 赤塚慎也、李 光華、川口真一、豊國伸哉 シンポジウム1:鉄動態と細胞機能 鉄を介した酸化ストレスによるゲノム変化と発がん 第39回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会(平成27年8月29日~30日、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
23. 赤塚慎也、李 光華、豊國伸哉 鉄を介した酸化ストレスによりゲノム変化と発癌 International Symposium 4: Cancer prevention and therapy targeting iron and oxidative stress. 第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月8日~10日名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
24. 王 越、岡崎泰昌、石 蕾、神田 容、豊國伸哉 中皮細胞の傷害及び発がんにおいてカーボンナノチューブの表面性質によるタンパク質吸着は重要因子である 第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月8日~10日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
25. 岡崎泰昌、周 珊瑚、酒井晃太、Alkin Dilnur、王 越、永井裕崇、三澤伸明、神山宣彦、豊國伸哉 中皮細胞傷害と発がん性はトリモライトに強く、アンソフィライトに弱い 第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月8日~10日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
26. 山下享子、永井裕崇、豊國伸哉 アネキシン A2 は中皮細胞によるアスベスト取り込みにおいて受容体として働く 第74回日本癌学会学術総会(平成27年10月8日~10日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
27. 豊國伸哉 教育講演9:アスベスト繊維による中皮腫発生機構 第54回日本臨床細胞学会秋季大会(平成27年11月21日~22日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
28. Toyokuni S. Cancer as ferrotoxic disease: What we have learned from animal experiments toward its prevention. SFRR-Asia 2015: Advanced oxidative stress research for health benefits and well-beings (Nov 29 – Dec 2, 2015; The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand; invited speaker)
29. Toyokuni S. Mukaide T, Hattori Y, Ito F, Mori M, Ohara Y, Hirayama T, Nagasawa H. Novel fluorescent probe detecting catalytic ferrous iron. 7th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan (Dec 7-10, 2015; University of Otago, Christchurch, New Zealand; invited speaker)
30. Toyokuni S. Iron as a ferrotoxic disease: what we have learned from animal experiments toward cancer prevention. International Conference on 20th Annual Meeting of Korean Society of Cancer Prevention (Dec 10-11, 2015; The Korea Chamber of Commerce and Industry, Seoul, Korea; invited speaker)
31. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis. 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Research-India (SFRR-India) and International Conference on Translational Research Ionizing Radiation, Free Radicals, Antidants & Functional Food (Jan 7-9, 2016; West Bengal University of Health Sciences, Kalyani, Nadia, West Bengal, India; invited speaker)