

REVIEW ARTICLE

## 鉄を視点とするアスベスト発がんの解明と 予防・診断・治療への応用の可能性

豊國伸哉<sup>1</sup>

### Elucidation of Asbestos-induced Carcinogenesis and Its Application to Prevention, Diagnosis and Treatment in Relation to Iron

Shinya Toyokuni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Biological Responses, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** Respiratory exposure to asbestos has been associated with mesothelioma in humans. However, its carcinogenic mechanism is still unclear. **Methods.** Here we studied the ability of chrysotile, crocidolite and amosite fibers to induce oxidative DNA damage and the modifying factors using 4 distinct approaches. **Results.** Electron spin resonance analyses showed that crocidolite and amosite containing high amounts of iron, but not chrysotile, catalyzed hydroxyl radical formation in the presence of hydrogen peroxide, which was enhanced by an iron chelator, nitrilotriacetic acid, and suppressed by Desferal<sup>®</sup>. Iron chelators, such as citrate, ATP and GTP, did not inhibit this reaction. Second, we used time-lapse videomicroscopy to evaluate how cells deal with asbestos fibers. RAW264.7 cells, MeT-5A and HeLa cells engulfed asbestos fibers, which reached not only cytoplasm but also the nucleus. Third, we utilized supercoiled plasmid DNA to evaluate the ability of each type of asbestos to induce DNA double strand breaks (DSBs). Crocidolite and amosite, but not chrysotile, induced DNA DSBs in the presence of iron chelators. We cloned the fragments to identify break ends. DSBs tended to occur within repeat sequences and between two G:C sequences. Finally, intraperitoneal administration of each type of asbestos to rats induced not only formation of nuclear 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the mesothelium but also significant iron deposits in the spleen. **Conclusion.** Together with the established carcinogenicity of intraperitoneal chrysotile, our data suggest that asbestos-associated catalytic iron, whether constitutional or induced by other mechanisms, plays a role in asbestos-induced carcinogenesis and that chemoprevention may be possible through targeting the catalytic iron.

(JLCC. 2009;49:362-367)

**KEY WORDS** — Asbestos, Mesothelioma, Iron, Oxidative stress

Reprints: Shinya Toyokuni, Department of Pathology and Biological Responses, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan (e-mail: toyokuni@med.nagoya-u.ac.jp).

**要旨** — **目的.** アスベストの発がん機構を解明する。**方法.** アスベスト(UICC:クリソタイル, クロシドライト, アモサイト)の物理化学的な性質を再検討する一方, 培養細胞や実験動物個体にアスベストの投与を行い, 生物学的性質を詳細に評価した。**結果.** ラジカル発生の触媒能はアモサイト>クロシドライト>>>クリソタイルであり, それは種々のキレート剤の存在で修飾を受けた。貪食細胞以外に, 中皮細胞や腺癌細胞もアスベスト繊維

を取り込み, 核内にいたることを観察した。supercoiled plasmid DNA を使用して, 各アスベストの2本鎖DNA切断能を検討した。鉄含量の高いアモサイトとクロシドライトで2本鎖切断を認め, 繰り返し配列部位やG:C塩基間で切断しやすいことが判明した。ラット腹腔内に各アスベスト繊維を投与すると, 全アスベスト投与グループで, 中皮細胞で酸化ストレス増加を認めるとともに特に脾臓において鉄沈着を認めた。**結論.** クリソタイル

<sup>1</sup>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。

別刷請求先: 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, 〒466-8550 名古屋市

昭和区鶴舞町 65(e-mail: toyokuni@med.nagoya-u.ac.jp)。

※第48回日本肺癌学会総会シンポジウム「悪性中皮腫の克服に向けて」。

ル腹腔内投与も中皮腫を発生する事実と考えあわせると、アスベスト発がんにはアスベストに含まれる鉄のみならず、他の機序で発生する過剰鉄も重要な役割を演じていることが示唆され、中皮腫発生の予防標的として期待される。

ていることが示唆され、中皮腫発生の予防標的として期待される。

**索引用語**——アスベスト、中皮腫、鉄、酸化ストレス

## はじめに

石綿（アスベスト）曝露と悪性腫瘍、特に中皮腫や肺癌との関連性は50年以上前より着目され、多くの疫学的調査がこれを支持しているが、その発がん機構に関しては未だ不明な点が多い。欧米では1990年代にアスベスト繊維使用の法的規制が取られるようになり、それ以後研究は下火となっていた。しかしながら、日本のアスベスト輸入量から予測される中皮腫発生のピークは2020年であり、今後合計10万人以上の発生が予想される。<sup>1</sup>このような状況においては、既にアスベスト曝露を受けた人においてどのような予防手段を取っていくかが極めて重要となる。そのためには、アスベスト繊維が中皮腫や他の悪性腫瘍を発生させるメカニズムを明らかにする必要がある。

中皮腫発生に関わるメカニズムに関しては、以下の4つのカテゴリーに分類できると考えられる。<sup>2,3</sup> 1. 酸化ストレス説：アスベスト繊維自体に含まれる鉄あるいはアスベスト繊維の異物としての性質より、アスベスト繊維周辺でフリーラジカル発生に伴う酸化ストレスが生じ、ゲノムDNAや脂質・蛋白質などを傷害する。この過程が発がん重要とするもの。<sup>4</sup> 2. 染色体分配障害説：細いアスベスト繊維が細胞分裂の際に染色体に絡まり、ゲノムに染色体レベルの異常を来すとするもの。3. 特定分子・変異原性分子の吸着説：アスベスト繊維は吸着力が高いため、生体内の特定の分子を吸着したり、体外からの変異原性分子を吸着し、これが発がんに寄与すると考えるもの。4. ウイルス説：1960年代にヨーロッパでポリオのワクチンにSV40ウイルスの汚染があったという事実があり、この不死化能を持つウイルス感染が発がんの原因と考えるもの。しかし、本説はこれまでの研究により日本においては否定的であるとされる。今回の実験においては、アスベストの物理化学的な性質を再検討する一方、培養細胞や実験動物個体にアスベストの投与を行い生物学的性質を詳細に評価した。

## 方法

### アスベスト繊維の形態・成分元素の解析

アスベスト繊維(UICC；クリソタイルA、クロシドライト、アモサイト)を労働安全衛生総合研究所より入手し、走査型電子顕微鏡(Hitachi S-4700)により形態の観

察を行った。同時にX線分析(EDS, Horiba SuperXenography, EMAX-5770)を行い、成分元素を解析した。

### アスベスト繊維のフリーラジカル産生触媒能の解析

アスベスト繊維と過酸化水素を混合し、スピントラップ剤(DMPO；5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)の存在下でラジカルが発生するかどうかをelectron spin resonance (ESR)で解析した。この際、種々の人工あるいは細胞内に存在する天然の鉄キレート剤の及ぼす影響を検討した。<sup>5</sup>

### アスベスト繊維の変異原性と変異スペクトラムの検討

過酸化水素存在下に2本鎖supercoiled plasmid DNAを使用して、DNA鎖切断とその切断部位の特性をアガロースゲル電気泳動とDNA断片のクローニング・切断端塩基配列決定により検討した。<sup>6,7</sup>

### 培養細胞のアスベスト繊維処理の観察

タイムラプス顕微鏡(Olympus IX70；iXon DV887, Andor Technology；Metamorph software, Molecular Devices)を使用して、種々の培養細胞がアスベスト繊維の添加にどう対処するのかを観察した。

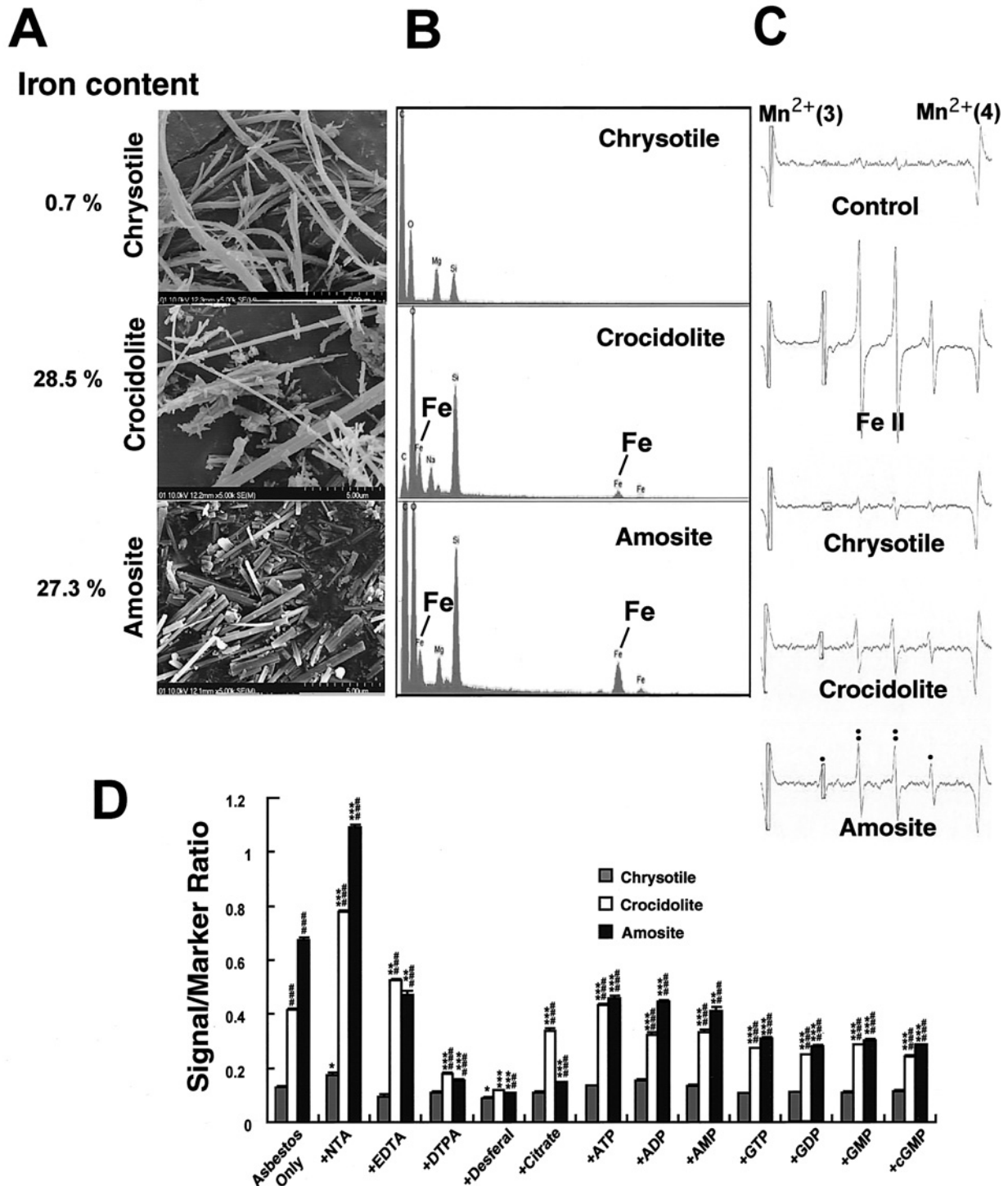
### 動物モデルの評価

8週令雄ウィスターラット(各群3匹)に各アスベスト繊維10mgを投与し、1週間後、4週間後に屠殺し、主要臓器を病理学的に検討した。ヘマトキシリン・エオジン染色ならびに鉄染色(Perl's iron staining)を施行した。また、8-hydroxy-2'-deoxyguanosineの免疫染色をavidin biotin complex法で行った。<sup>8,9</sup>

## 結果

### アスベスト繊維のフリーラジカル生成能の解析

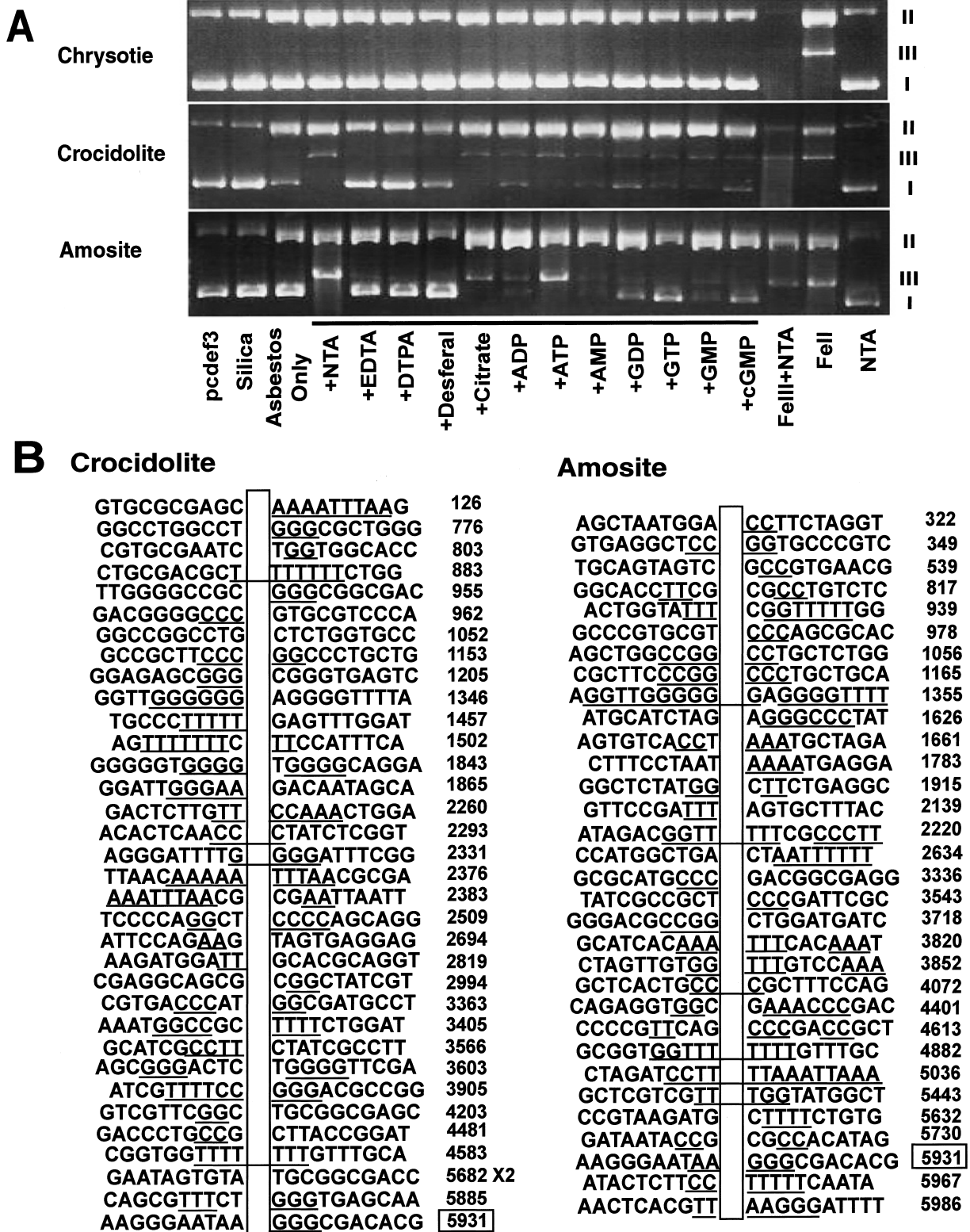
標準化された3種類のアスベスト繊維(クリソタイルA、クロシドライト、アモサイト)の形状を走査型電子顕微鏡で観察し、その含有元素を測定した。クロシドライトとアモサイトに鉄が多量に含まれていることが確認された(Figure 1A, 1B)。ESRを使用して、各アスベスト繊維のフリーラジカル産生能を測定した。過酸化水素(10mM)の存在下でアスベスト繊維を触媒としてヒドロキシラジカルが発生し、3種類のアスベスト繊維のうちアモサイトのフリーラジカル生成能が最も高いことが判明した(Figure 1C)。この反応を調節する可能性のある合成鉄キレート剤4種(Desferal<sup>®</sup>, DES；diethylenetriaminepenta-acetic acid, DTPA；ethylenediaminetetra-acetic



**Figure 1.** Morphological and compositional analyses of asbestos fibers and their catalytic activity for free radical generation. **A;** Morphological analysis by scanning electronmicroscopy. **B;** Compositional analysis by X-ray. **C;** ESR analysis in the presence of hydrogen peroxide. **D;** Modification of catalytic activity of asbestos fibers by different iron chelators (\*vs asbestos only, # vs chrysotile; \*, #, P<0.05; \*\*, ##, P<0.01; \*\*\*, ###, P<0.001).

acid, EDTA : nitrilotriacetic acid, NTA)あるいは細胞内に常在するキレート分子8種 (citrate, ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, cGMP)を反応に加え変化を

検討したところ, NTAはこの触媒作用を最も促進すること, ならびにクエン酸やリン酸化合物の存在下でもアスベスト繊維にはこの触媒作用があることを観察した



**Figure 2.** Analyses of *in vitro* oxidative DNA damage catalyzed by asbestos fibers. Supercoiled plasmid DNA was used to evaluate single and double DNA-strand breaks. **A**; Single and double strand breaks catalyzed by asbestos fibers in the presence of iron chelators. I, supercoiled form; II, circular form; III, linear form. **B**; Sequence specificity of crocidolite- or amosite-catalyzed breakpoints in plasmid DNA.

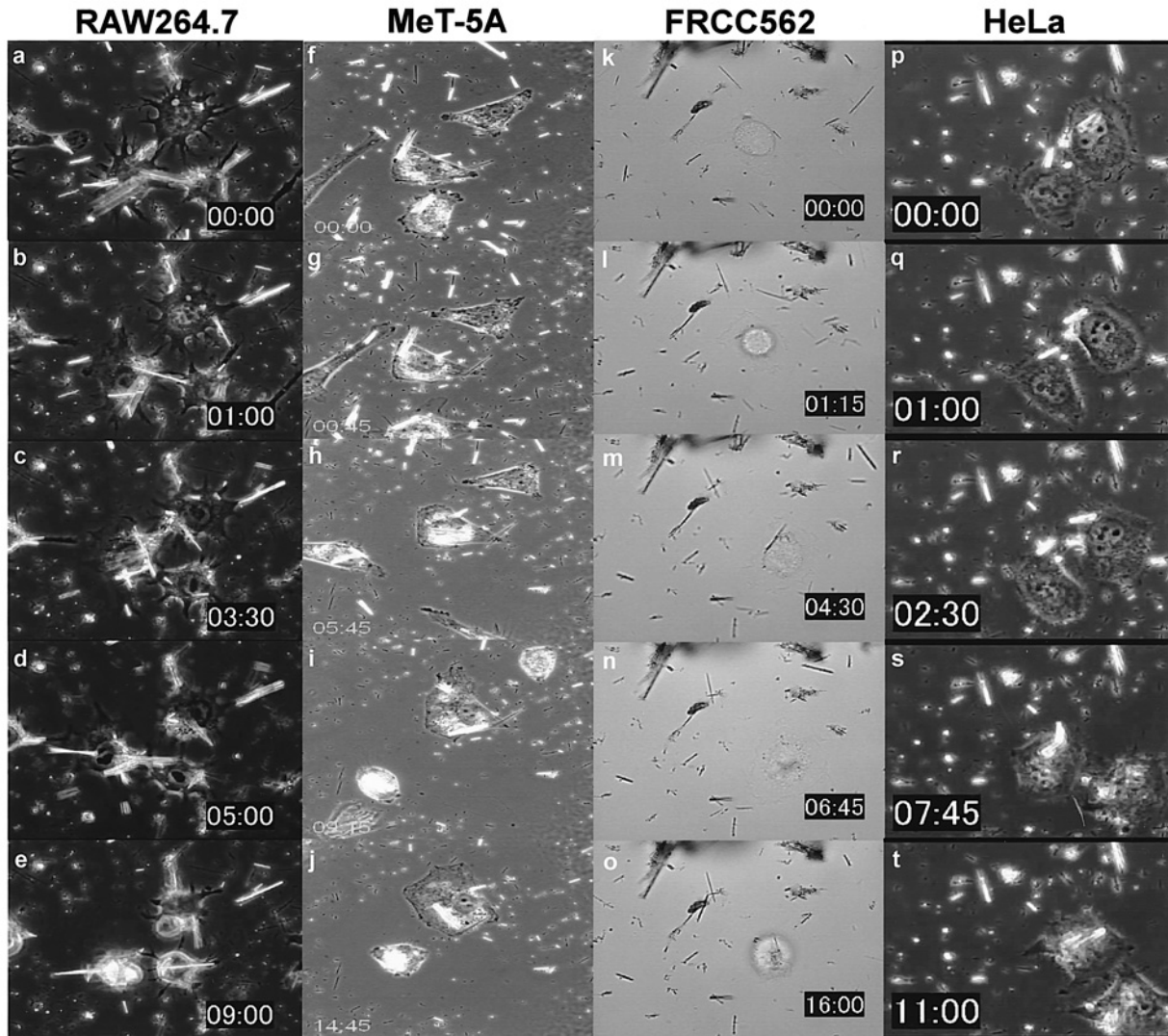


Figure 3. Pictures of time-lapse videomicroscopy. Four different kinds of cells engulfed asbestos fibers (crocidolite).

(Figure 1D).

#### アスベスト繊維による突然変異特性の解析

Supercoiled plasmid DNA に過酸化水素存在下にアスベスト繊維を加え反応させ、2本鎖切断の特徴を解析した。クロシドライトとアモサイトでしかも NTA, ATP, ADP といったキレート剤の存在下で2本鎖切断は起こった。その切断端はグアニン・シトシン (G:C) 間で切れる可能性が高く、また多くの場合切断端両側に繰り返し配列を認めた (Figure 2A, 2B)。

#### 培養細胞のアスベスト繊維処理の観察

RAW264.7 (マクロファージ), MeT-5A (非トランスフォーム中皮細胞株), FRCC562 (鉄ニトリロ三酢酸誘発ラット腎癌細胞), HeLa (子宮頸部腺癌) のすべての細胞は16時間の継続的観察の間にクロシドライトを細胞内に取り込み、その一部は核内に到達していた (Figure 3)。

#### アスベスト曝露後の酸化ストレスに関する解析

アスベスト繊維投与動物の臓器を形態学的に検討すると、アスベスト投与全グループにおいて、中皮細胞で酸化的DNA塩基損傷である8-hydroxy-2'-deoxyguanosineの染色性が増加すると同時に、脾臓において著明な鉄の沈着を認めた (データ省略)。

#### 考察

アスベスト繊維そのものの鉄の含量はアモサイト (Fe<sup>++</sup>) > クロシドライト (Fe<sup>+++</sup>) >>> クリソタイルであり、ヒドロキシラジカル発生に関する触媒活性はこれにほぼ比例した。試験管内の変異原性もこれに正比例をするものであった。ここで、繰り返し配列やG:Cを標的としてDNA2本鎖切断を起こすことは発がん機構を考える上でたいへん興味深い。また、これらの反応

はすべて、生体に存在する天然の鉄キレート剤の存在下でも起こることが確認されたことは興味深い。

アスベスト繊維は貪食細胞以外の細胞へも積極的に取り込まれた。そして、多くの場合核内に到達することが明らかとなった。これはアスベスト繊維が細胞内の蛋白などの分子と親和性が高いことを意味しており、今後その同定が重要な課題となるだろう。また、アスベスト繊維が取り込まれる際、どのような分子あるいは受容体を介して細胞内へ入るのか、その機序の解明が望まれる。

疫学的事実に基づいてクロシドライトやアモサイトはヒトで発がん性の高いアスベストとされているが、<sup>10</sup> クリソタイルをラット腹腔内に投与すると、高率に中皮腫が発生することが知られている。<sup>11</sup> 今回の結果より、アスベストに既に曝露されたヒトの中皮腫発生予防には、鉄代謝を鉄欠乏方向へ修飾変化させることが有効であることが示唆される。この方法にはフリーラジカル反応の開始を止める作用がある。これまでアスベスト曝露者に対する肺癌予防に抗酸化剤としてβカロチンやレチノールが使用されたが、かえって喫煙者の場合肺癌のリスクをあげるというデータが発表されている。<sup>12</sup> これは、抗酸化剤自体が寿命の比較的長いラジカルとなり、ゲノム傷害を促進したためとも解釈される。何らかのキレート剤で鉄代謝自身を修飾する場合には、喫煙者・非喫煙者に関わらずラジカル反応の収束方向へ作用することが期待される。

## REFERENCES

1. Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med*. 2005;353:1591-1603.
2. Roggli VL, Coin P. Mineralogy of Asbestos. CH 1. In: Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, eds. *Pathology of asbestos-associated diseases*. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2004:1-16.
3. Dodson RF, Hammar SP. *Asbestos: Risk assessment, epidemiology, and health effects*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2006.
4. Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med*. 1992;12:293-315.
5. Kawabata T, Awai M, Kohno M. Generation of active oxygen species by iron nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Acta Med Okayama*. 1986;40:163-173.
6. Toyokuni S, Sagripanti JL. DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1993;14:223-227.
7. Toyokuni S, Sagripanti JL. Induction of oxidative single- and double-strand breaks in DNA by ferric citrate. *Free Radic Biol Med*. 1993;15:117-123.
8. Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest*. 1997;76:365-374.
9. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*. 1999; 49:91-102.
10. McDonald AD, McDonald JC, Pooley FD. Mineral fibre content of lung in mesothelial tumours in North America. *Ann Occup Hyg*. 1982;26:417-422.
11. Davis JM, Addison J, Bolton RE, Donaldson K, Jones AD. Inhalation and injection studies in rats using dust samples from chrysotile asbestos prepared by a wet dispersion process. *Br J Exp Pathol*. 1986;67:113-129.
12. Cullen MR, Barnett MJ, Balmes JR, Cartmel B, Redlich CA, Brodtkin CA, et al. Predictors of lung cancer among asbestos-exposed men in the β-carotene and retinol efficacy trial. *Am J Epidemiol*. 2005;161:260-270.