

〈特別研究課題〉 建築性廃棄物となったCCA処理木材の発癌毒性の
評価と毒性減弱方法の開発
助成研究者 中部大学 加藤 昌志



建築性廃棄物となったCCA処理木材の発癌毒性の評価と 毒性減弱方法の開発

加藤 昌志
(中部大学)

Establishment of preventive therapy for heavy metal- related diseases through analysis for carcinogenic risk of CCA (cupper, chromium and arsenic)-treated woods

Masashi Kato
(Chubu University)

Abstract:

Here, we first examined the mechanism of arsenic-mediated protein tyrosine kinase activation. We then examined the effect of arsenic on levels of fibroblast-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -14, which have been reported to be associated with tumor progression. First, arsenic promotes production of the fibroblast-derived active form of MMP-2. Arsenic (100 and 1000 μ M) also increased MMP-14 expression levels in fibroblasts. Finally, 1000 μ M of mercury, but not arsenic, directly affects pro-MMP-2 protein and converts the proenzyme into its active form. As MMP-14 is an activator of pro-MMP-2, our results suggest that arsenic promotes production of the fibroblast-derived active form of MMP-2 through augmentation of MMP-14. The activity of arsenic for conversion of pro-MMP-2 into its active form may be weaker than that of mercury. These results may be useful to develop treatments for reduction of carcinogenic risk of CCA-treated woods.

1. はじめに

CCA（クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤）処理木材は、木材の防腐・防蟻を目的として処理されたもので、昭和38年から使用され、昭和45年頃から長期にわたり年間10万トン近く使用された。現在は、環境基準の改定もあり、ほとんど使用されていない。しかしながら、今後、建築物の解体に伴いCCA処理木材が建築系廃棄物として大量に排出され、健康や環境に影響を与える事が問題視されている。欧州委員会（EC）は、2001年「ヒ素」を含む木材防腐処理剤（CCA防腐処理木材）の使用禁止を提案した。欧州委員会企業総局は「重金属が健康に与える直接的影響」、「癌の誘発」、「ヒ素によって生じる低リン酸塩海域における水生生物への影響」等の理由で2002年末までにCCA処理木材の使用を禁止した。これらは、クロム・銅・ヒ素の重金属のうち、強い発癌性がヒトで証明されているヒ素が特に問題になっていることを示している。CCA処理木材には460 mg/kg程度のヒ素が含まれ、この焼却灰には約180-360 mg/kgのヒ素が含まれる。焼却灰の値は、環境省の定めた「金属を含む煤塵・汚泥に係る判定基準」をはるかに上回る濃度である。さらに、問題はヒ素の発癌機構がほとんど不明であるため、基準値そのものが詳細な科学的知見に基づいて検討されたものとは言えない事である。それゆえ、基準値は各国間でばらつきがあり、近年でも改訂が加えられている。こうした状況から、ヒ素をはじめとするチオール基反応性重金属における人体に対する発癌毒性を医学・生物学的に解析・評価し、科学的根拠に基づいた基準値を策定するとともに、健康への影響に配慮した適切なCCA処理木材廃棄処理方法の開発が望まれている。

癌原遺伝子c-RETは受容体型チロシンキナーゼをコードしている。リガンドであるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)がRET受容体に結合することにより二量体が形成されることにより活性化される。RETキナーゼの活性化は、下流にあるMAPキナーゼ等のシグナル伝達分子を活性化し、細胞増殖を促進させることが知られている（Kato *et al.*, 2000）。実際に、c-RETは、変異により癌遺伝子（RET-PTC1やRET-MEN2A等）へと変化し、活性が亢進することにより、ヒトの甲状腺癌や多発性内分泌腺腫症（MEN）を誘発することが知られている（Kato *et al.*, 2000）。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は亜鉛結合endopeptidaseのファミリーに属し、この発現は悪性腫瘍の浸潤や転移に関与している (Stetler-Stevenson, 1990)。特に、MMP-2とMMP-14は腫瘍の進展に深く関与していることが報告されている (Dalberg *et al.*, 2000; Noël *et al.*, 1994)。MMP-2はプロエンザイム型 (pro-matrix metalloproteinase-2; pro-MMP-2)として分泌され、腫瘍増殖依存性に活性化される (Stetler-Stevenson, 1990; Kato *et al.*, 1998)。MMP-14の発現レベルは、MMP-2の活性化に深く関与しているのみならず、癌患者の予後に関係している (Nomura *et al.*, 1995; Itoh *et al.*, 2006)。MMP-2とMMP-14は悪性腫瘍細胞だけでなく、腫瘍周囲の線維芽細胞からも分泌される (Dalberg *et al.*, 2000; Noël *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2006)。悪性腫瘍細胞におけるMMP-14の発現は腫瘍の浸潤性増殖に関与しているのに対して、線維芽細胞におけるMMP-14の発現は、悪性腫瘍細胞の浸潤性増殖による組織リモデリングの過程に関与していると考えられている (Ohtani H *et al.*, 1996)。

RET癌原遺伝子産物（c-RETキナーゼ）やRET癌遺伝子産物（RET-MEN2Aキナーゼ）は、癌の病態を制御する最も重要な分子の1つである（Kato *et al.*, 2002）。しかし、ヒ素が癌原遺伝子産物や癌遺伝子産物を活性化するメカニズムは、ほとんど解明されていない。一方、MMP-2とMMP-14は悪性腫瘍の進展に決定的に重要な役割を果たしているのであるが、ヒ素を介した活性型MMP-2の

分泌機構については、ほとんど報告がない。さらに、我々の調べうる範囲では、ヒ素がMMP-14の発現に与える影響について言及してある報告はなかった。本研究では、ヒ素がc-RETキナーゼ、RET-MEN2Aキナーゼ、MMP-2、MMP-14に与える影響に焦点を当て、ヒ素を介した悪性腫瘍発症について新しい可能性を提案し、本機構に基づいたCCA木材の廃材処理について考察する。

2. 実験方法及び実験材料

本研究では、NIH3T3細胞及びNIH3T3細胞にc-RET癌原遺伝子やRET-MEN2A癌遺伝子を導入した安定株を使用し、こうした細胞にヒ素を投与し、c-RETキナーゼ、RET-MEN2Aキナーゼ、MMP-2、MMP-14について、発現や活性のレベルを調べた。ヒ素 (NaAsO₂) は、和光純薬より購入した。抗β-アクチン抗体と4-aminophenylmercuric acetate (APMA)はSigma-Aldrichより購入した。抗MMP-14抗体とBB-94は、金沢大学の佐藤博教授より供与された。リコンビナント pro-MMP-2 蛋白質は以前に述べられた方法 (Li *et al.*, 2004) で作製された。ザイモグラフィとウエスタンブロットは、以前に述べられた方法にしたがって行われた (Kato *et al.*, 1998)。MMP-14の劣化を予防する目的で、線維芽細胞の培養にBB-94が使用された。

3. 結果

A) ヒ素のチロシンキナーゼに対する作用

ヒ素は、c-RETキナーゼのみならず、遺伝子変異により既に活性化されているRET-MEN2Aキナーゼの活性をさらに亢進させるスーパー活性化作用を持っていることがわかった。さらに、従来までに、ヒ素は遺伝子レベルで作用して発癌毒性を発揮することが、多くの研究者より報告されている。本研究では、従来の報告とは全く異なる機構で、ヒ素が癌遺伝子産物の活性化を誘導する可能性を示した。

B) ヒ素のMMPに対する作用

無刺激の線維芽細胞において、活性型MMP-2は、ほとんど検出できなかった。100μMと1000μMのヒ素は、線維芽細胞からの活性化型MMP-2の分泌を有意に亢進させた (図1. a)。そこで、ヒ素は線維芽細胞におけるMMP-14の発現レベルを賦活するかどうかを調べた。無刺激の線維芽細胞では、MMP-14の発現はほとんど検出できなかったが、100μMと1000μMのヒ素は、線維芽細胞におけるMMP-14の発現を著明に亢進させた (図1. b) (Kato *et al.*, 2008)。

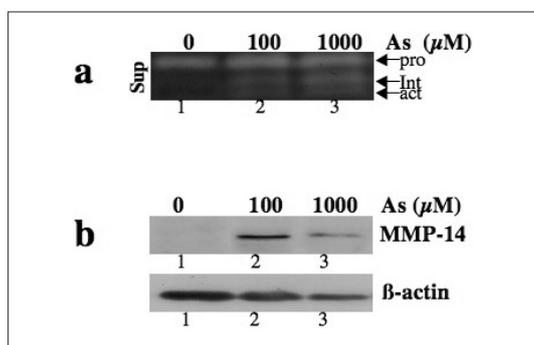


図1. a: ザイモグラフィ
b: MMP-14及びβ-アクチンのウエスタンブロットの結果 (Kato *et al.*, 2008より引用)

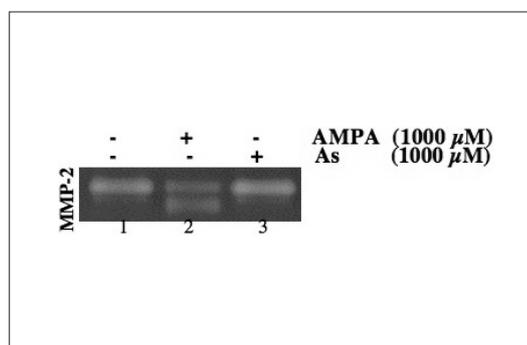


図2. リコンビナントMMP-2を用いたザイモグラフィ (Kato *et al.*, 2008より引用)

MMP-14の発現非依存的に活性化型MMP-2の産生が亢進する経路があることは既に知られている(Zhou *et al.*, 2005)。実際に、我々の結果では、1000 μ Mの水銀(APMA)が、直接不活性化型MMP-2 (pro-MMP-2) 蛋白質に作用し、活性化型MMP-2の産生を促進するという結果を得た。そこで、最後に、ヒ素も水銀のように直接不活性化型MMP-2蛋白質に作用し、活性化型MMP-2蛋白質を誘導するかどうかを調べた。予想に反して、100 μ M及び1000 μ Mのヒ素は、不活性化型MMP-2蛋白質を直接変換し、活性化型MMP-2蛋白質を産生することはなかった。これは、不活性化型MMP-2蛋白質を活性化型MMP-2蛋白質に変換する作用については、ヒ素は、水銀よりも弱い可能性を示している (図2) (Kato *et al.*, 2008)。

4. 考察

NIH3T3細胞は線維芽細胞の一種であり、形質転換活性や転移能は持っていない(Kato *et al.*, 2002)。

NIH3T3細胞にc-RET遺伝子を導入しても形質転換はおこらない。しかし、RET-MEN2A遺伝子を導入した場合には、形質転換がおこる (Kato *et al.*, 2002)。こうした形質転換には、RET-MEN2A遺伝子産物 (キナーゼ) の活性レベルが深く関与していることが知られている(Kato *et al.*, 1998)。本研究では、ヒ素のスーパー活性化のみならず、ヒ素を介したキナーゼの活性化の新しい機構を示した。本研究にて発見されたヒ素が癌を誘発する新機構に基づいて発癌予防剤を開発することにより、CCA木材の発癌毒性を軽減できる可能性がある。

活性化型MMP-2は、悪性の細胞に特異的に検出され、通常、良性の細胞では検出されない(Azzam *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993)。我々の「ヒ素が活性化型MMP-2の分泌を促進する」という結果は、線維芽細胞がヒ素刺激を受け、1つ悪性の性質を獲得したことを示している。MMP-14は、不活性化型MMP-2 に作用して活性化型MMP-2を誘導する(Seiki *et al.*, 2003)ので、我々の「ヒ素を介したMMP-14発現の亢進」という結果は、ヒ素はMMP-14の発現促進を介して活性化型MMP-2産生を亢進することを示している。腫瘍周辺の線維芽細胞由来のMMP-14は試験管内においても、生体内においても腫瘍の浸潤を促進することが報告されている(Zhang *et al.*, 2006)。ヒ素は、線維芽細胞におけるMMP-14の発現の亢進を介して悪性腫瘍の病態に関与しているかもしれない。健康人の髪の毛1グラムあたりのヒ素含有量はほぼ500 μ (250-880 μ g) である。これが1000 μ g/g をこえるとヒ素中毒である(Cöl *et al.*, 1999)。これらのヒトにおけるヒ素濃度は、100~1000 μ Mのヒ素が線維芽細胞における活性化型MMP-2とMMP-14の発現を増加させるのに十分である可能性を示している。

癌遺伝子産物 (v-Srcチロシンキナーゼ) の活性化は、MMP-14の発現増強を介してMMP-2の活性化を誘導する可能性が示されている (Kadono *et al.*, 1998)。本研究では、ヒ素によるRETキナーゼの活性化とMMP-14発現の亢進が示されている。これらの結果は、ヒ素が、RETキナーゼの活性化を介してMMP-14の発現を制御している可能性を示している。

以上のように、本研究では、CCA木材において、強い発癌性を持つヒ素に焦点をあて、ヒ素を介する新しい発癌機構を提案したのみならず、発癌毒性を制御する可能性を持つヒ素の標的を提案した。本発癌機構に基づいた薬物を探索することにより、廃材となったCCA木材の処理を安全に行うことができると期待される。

5. 謝辞

本研究にご支援いただいた、財団法人日比科学技術振興財団に深謝申し上げます。また、本課題について、技術支援の補助をしていただいた加藤容子、大神恭子、高橋由美子の諸氏に感謝の意を表す。

6. 参考文献

- Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. 1993. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 85:1758-1764.
- Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NS, Gatter KC, Carmichael J. 1993. Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85:574-578.
- Cöl M, Cöl C, Soran A, Sayli BS, Oztürk S. 1999. Arsenic-related Bowen's disease, palmar keratosis, and skin cancer. *Environ Health Perspect* 107:687-689.
- Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Backdahl M. Gelatinase A. 2000. Membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 24:334-340.
- Itoh Y, Seiki M. 2006. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206:1-8.
- Kato M, Hossain K, Iida M, Sato H, Uemura N, Goto Y. 2008. Arsenic enhances matrix metalloproteinase-14 expression in fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A* 71:1053-5.
- Kato M, Iwashita T, Takeda K, Akhand AA, Liu W, Yoshihara M, Asai N, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. 2000. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol Biol Cell* 11:93-101.
- Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, Iwamoto T, Suzuki H, Nakashima I. 1998. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17:1885-1888.
- Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Iwashita T, Akhand AA, Senga T, Yamamoto M, Sobue G, Hamaguchi M, Takahashi M, Nakashima I. 2002. Repair by Src kinase of function-impaired RET with multiple endocrine neoplasia type 2A mutation with substitutions of tyrosines in the COOH-terminal kinase domain for phenylalanine. *Cancer Res* 62:2414-2422.
- Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H. 2004. Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. *Cancer Res* 64:7058-7064.
- Noël AC, Polette M, Lewalle JM, Munaut C, Emonard HP, Birembaut P, Foidart JM. 1994. Coordinate enhancement of gelatinase A mRNA and activity levels in human fibroblasts in response to breast-adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 56:331-336.
- Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. 1995. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55:3263-3266.

- Ohtani H, Motohashi H, Sato H, Seiki M, Nagura H. 1996. Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *Int J Cancer* 68:565-570.
- Kadono Y, Okada Y, Namiki M, Seiki M, Sato H. 1998. Transformation of epithelial Madin-Darby canine kidney cells with p60(v-src) induces expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Res* 58:2240-4.
- Seiki M, Koshikawa N, Yana I. 2003. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 22:129-143.
- Stetler-Stevenson WG. 1990. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 9:289-303.
- Zhang W, Matrisian LM, Holmbeck K, Vick CC, Rosenthal EL. 2006. Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 6:52.
- Zhou D, Lee HS, Villarreal F, Teng A, Lu E, Reynolds S, Qin C, Smith J, Sung KL. 2005. Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts. *J Orthop Res* 23:949-957.