

厚生労働科学研究費補助金研究報告書
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究 (20KD1003)
研究実施期間：令和2年度4月1日から令和3年度3月31日まで (3年計画の1年目)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内木 綾

令和3年(2021年)5月

目 次

I. 総括研究報告書	
ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発に関する研究	1
内木 綾	
II. 研究分担報告書	
1. カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーの肺における有害性の比較と有害性指標の検索	
内木 綾	9
2. 次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム変異解析	
戸塚 ゆ加里	14
3. カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーによる肺内酸化ストレス解析	
梯 アンナ	18
4. 経気管肺内噴霧投与(TIPS)法によるカーボンナノチューブ有害性の解析	
津田 洋幸	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24

研究課題名：ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 実験病態病理学 准教授

研究要旨

ナノサイズの金属・カーボン・有機物粒子・繊維状物質は非常に安定であり、吸入された場合は組織・細胞に長期間沈着する。従来の化学物質が、物質自体の代謝変換によって障害や発がんを誘発するのとは異なり、ナノマテリアルの障害性及び発がん性には、不可逆的な蓄積とそれに対する慢性的な炎症や異物反応が関与する。申請者らはこれまでに、吸入暴露試験で発がん性を認めた MWCNT-7 を含めた複数のカーボンナノチューブ (CNT) について、経気管肺内噴霧投与方法 (TIPS 法) を用いた肺および中皮発がん性の検出に成功した。本研究では、物性の異なる CNTs をモデル物質として、TIPS 投与によるラット肺・胸膜中皮発がん性の有無、および発がん性の程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより求められた CNT の Adverse Outcome Pathway (AOP) を、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的として行う。本年度は、肺発がん性が検出された MWCNT-7、NWCNT-N を陽性対照として、肺発がん性が未知であるフラーレン (FL)、フラーレンウィスカー (FLW) について、TIPS 投与による肺腫瘍性病変の発生と酸化ストレス蓄積について解析した。また、CNT の吸入暴露および TIPS 投与による肺・胸膜中皮発がん性試験において、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析を行った研究は皆無であり、CNT 発がんの特徴的な変異シグネチャーの検出を目指して、MWCNTs により発生した肺腺癌と周囲正常肺組織から DNA 抽出を開始した。

その結果、MWCNT-7、MWCNT-N では肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FL および FLW 投与群では腺癌の発生を認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。肺発がん性を示す MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群において、投与後 104 週のみならず、1 週においても肺胞上皮細胞核における活性酸素種 (ROS) レベルの上昇が見られたことから、酸化的ストレスは CNT による AOP として重要で、発がん機序に強く関与すること、また発がん性の短期予測指標になりえる可能性が示唆された。ホルマリン固定肺組織からゲノム DNA を抽出した結果、分解が進んでおり全ゲノム解析に至らなかった。

現在、MWCNT-7、MWCNT-N を含む、壁層数・形状・長さが様々な CNTs について、TIPS 投与を開始しており、肺・中皮の毒性変化について、亜急性期・亜慢性期・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて、経時的なサンプルを回収し次第、病理組織、酸化ストレスなど基本的な毒性について定量解析する。ホルマリン固定組織由来 DNA の分解は、ホルマリン固定時間に起因しているものと考えられ、今後得られるサンプルに関しては、固定時間を短くし、NGS による全ゲノム解析を行い、CNT 変異シグネチャーの同定を試みる。また *in vitro* 系として、マウス肺オルガノイドの培養条件を検討しており、TIPS 試験と同様の CNT 暴露による細胞層増殖活性や ROS の変化を解析する。

研究分担者

戸塚 ゆ加里 国立研究開発法人国立がん
研究センター ユニット長
梯 アンナ 大阪市立大学大学院医学研究科 講師
津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室
特任教授

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ (CNT) は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECD では、

CNT を含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今までに 1 物質 (MWCNT-7) が日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法 (TIPS 法) を用いた試験デザインを開発し、4 種の MWCNT について肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。

健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー (NGS) によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン (変異シグネチャー) が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シ

グネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)を得ることも可能であることが示されている。

本研究では、CNT や CNT と同様に炭素原子から構成されるフラーレン (FL) およびフラーレンウィスカー (FLW) の TIPS 投与による肺と胸膜中皮に対する障害性および発がん性について、酸化ストレスレベルや、NGS による遺伝毒性との関連を解析する。発がんに関与する変異シグネチャーを同定し、CNT の物性 (層数、形状や鉄含有量) と照合することにより、責任物性を推定することが可能であると考えられる。さらに、同定した遺伝子変化の情報を用いて、CNT の Adverse Outcome Pathway (AOP) を構築し、有害性評価指標として応用可能で信頼の高いものの選出することを目標とする。また、TIPS 投与後、発がん期に至る以前の亜急性・亜慢性期の非腫瘍部や *in vitro* 投与においても検出することが可能な AOP は、*in vitro* 系試験法を含む短期・簡便な試験法における評価指標に利用できる可能性を含み、それらに言及する成果体を得ることも目指す。

B. 研究方法

(1) TIPS法によるFLおよびFLWの肺発がん性の検証

今年度は、CNTによるAOPを求めるのに最適な解析方法を検討するため、MWCNT-7、MWCNT-N、FLおよびFLWをTIPS投与後、発がん期(104週間)に到達したラットの肺発がん性を解析することにより、発がん性が未知であるFLとFLWの発がん性の有無と酸化ストレスや遺伝子変化を検証する。

FW、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nは、PFポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ合計投与量が0.25あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与(対照)群を設ける。投与後1週と104週間にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺(1週は無処置群、対照群およびFL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nの高用量群から各群5匹、104週は各群20匹)して、肺の急性病変と発がんについて解析する。投与後1週では、対照群と比較して、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、肺重量の有意な増加(いずれも $P < 0.001$)、CD68陽性マクロファージの増加(FLW: $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N: $P < 0.001$)を認めたが、肺胞内の好中球浸潤、炎症性サイトカイン*Cc12*および*Cc13*のmRNA発現レベルと活性酸素種(ROS)蓄積量は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群でのみ対照と比較して有意に上昇した(いずれも $P < 0.001$)。急性肺毒性の結果から、ナノチューブ投与による酸化ストレスの誘発は、CNTによる肺毒性、発がん性のKey Eventであり、ゲノム変異の原因や早期発がんマーカーとなる可能性がある。そこで104週目では、TIPS投与した被験物質の肺内沈着量の定量、病理組織学的な腫瘍性病変の定量による発がん性の解析とともに、発がん性に対する酸化ストレスおよびゲノム変異の寄与を検証する(津田、内木)。肺内被験物質沈着量は、小片に切り刻んだ肺に対して5%硝酸水溶液を20mL加え、マイクロ波前処理装置(Multiwave GO, Anton Paar)で溶解しHPLC測定する(LC-10、島津製作所)(内木)。酸化

ストレスは、ROSによるDNA損傷により蓄積される8-OHdGを指標として、ホルマリン固定パラフィン包埋(FPPE)肺標本を用いた免疫染色法(Anti-8OHdG mouse monoclonal Antibody, MOG-100P, JaICA、日本)により陽性細胞数を定量解析する(梯、内木)。また予備実験として、肺凍結サンプルから抗酸化剤NaI液を含むDNA Extractor WB kit(和光純薬工業)DNAを抽出し、Nuclease P1(和光純薬工業)およびAlkaline phosphatase(Sigma-Aldrich)の処理によって消化を行い、ELIZA法(高感度8-OHdGチェック kit, JaICA)を用いて8-OHdG形成レベルの変化を調べる(梯、内木)。ゲノム解析は、肺FPPEサンプルを用い、NGSによる体細胞変異解析を実施する。ラットにMWCNT-7で誘発した肺腺癌(N=3)およびMWCNT-Nで誘発した肺腺癌(N=2)のFPPEサンプルから、腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FPPE DNA microTUBE Kit-Column Purification(Covaris)を用いて抽出する。同一個体から非腫瘍部に相当する箇所も削り出し、同様にゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAを次世代シーケンサー(NovaSeq)で全ゲノム解析を行い、腫瘍に検出される体細胞変異の解析を行う。得られたデータをNMF(Nonnegative Matrix Factorization; 非負行列因子分解)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う(戸塚、内木)。

(2) CNTの物性と発がん性の解析

上記のMWCNT-7、MWCNT-Nを含む、壁層数・形状・長さが様々なCNTsについて、ラットにTIPS投与することにより、肺および中皮の毒性変化について、亜急性期・亜慢性期・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて詳細に解析する。12週齢F344雄ラットに各種CNTを4週間に合計が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるようにTIPS投与する。また発がんにおける比較対照として、既知の発がん物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)を4000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)を200mg/kgとなるようにした群を設ける。群構成はMWCNT-7、MWCNT-N、SWCNT、DHPN、NNK、無処置、溶媒対照とし、以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に屠殺する。屠殺時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取したのち、採血、胸郭を主体とした主要臓器を採取する(津田、内木)。亜急性期(4週)では、FPPEの病理組織学的解析により、炎症、組織障害や増殖活性の変化について解析する。HPLCにより被験物質の肺沈着量を測定する(内木)。凍結標本により、*Cc1*等の炎症性サイトカインレベルの定量を行う。ROSの定量は(1)の手法と同様に免疫染色で確認する(梯、内木)。亜慢性期以降の解析では、これらの解析に加えて、FPPEあるいは凍結検体由来ゲノムDNAを用いて、NGSによる全ゲノム解析を行う予定である(戸塚、内木)。

(3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

1. Mφ細胞における毒性解析

マウスMφ細胞(RAW264.7)に、(2)で用いたCNTを投与する(0.5mg/ml、*in vivo* 0.5mg/ラット相当)。マウ

スMφから産生される炎症性サイトカイン (ELIZA、定量的RT-PCR) やROS (DCF-DAアッセイ) を定量する (内木)。

2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

本研究で用いる肺オルガノイドは、C57BL/6Jマウス肺から採取する。単層の嚢胞状を呈し幹細胞のほか線毛をもつような分化した細胞から構成される。本年度は、まず肺オルガノイドの至適培養条件を検討する (内木)。

(倫理面の配慮)

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え

実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており (H28M-45、医動20-028)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

C. 研究結果

(1) 肺発がん性に対するFLおよびFLWの影響

(1)-1. 肺腫瘍性病変の定量解析 (津田、内木)

TIPS投与中の動物死亡により、発がん性の評価は、無処置群 (20匹)、対照群 (17匹)、FL0.25 (mg、以下省略) 群 (20匹)、FL0.5群 (19匹)、FLW0.25群 (20匹)、FLW0.5群 (18匹)、MWCNT-70.25群 (20匹)、MWCNT-70.5群 (20匹)、MWCNT-N0.25群 (20匹)、MWCNT-N0.5群 (20匹) で行った。104週間の観察期間中途中死亡動物が発生したため、最終的に104週では、無処置群 (12匹)、対照群 (13匹)、FL0.25群 (14匹)、FL0.5群 (12匹)、FLW0.25群 (15匹)、FLW0.5群 (13匹)、MWCNT-70.25群 (15匹)、MWCNT-70.5群 (15匹)、MWCNT-N0.25群 (17匹)、MWCNT-N0.5群 (12匹) を剖検した。途中死亡例では、自然発生の白血病、皮下腫瘍や甲状腺腫瘍などが死因であった。組織学的には、無処置群、対照群、FL0.5群、FLW0.25群、FLW0.5群とMWCNT-70.25群では明らかな肺病変の発生を認めなかったが、FL0.25群 (1/7匹) に肺胞上皮過形成、MWCNT-70.5群 (1/5匹)、MWCNT-70.25群 (1/3匹) とMWCNT-N0.5群 (2/8匹) に肺胞上皮腺癌を認めた。

104週における剖検例では、体重、臓器重量 (肺、肝、腎、脾、脳) を測定し、MWCNT-N0.25群の全体肺重量、相対肺重量 ($1.74 \pm 0.39\text{g}$, $P < 0.05$, $0.40 \pm 0.08\%$, $P < 0.05$) が、対照群 ($1.35 \pm 0.38\text{g}$, $0.31 \pm 0.08\%$) と比較して有意に高値であった。その他には有意な変化は認めなかった。肺を組織学的に解析し、途中死亡例と合わせて解析した結果、肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群 (0/20匹)、対照群 (1/17匹)、FL0.25

群 (2/19匹)、FL0.5群 (0/19匹)、FLW0.25群 (0/20匹)、FLW0.5群 (1/18匹)、MWCNT-70.25群 (4/20匹)、MWCNT-70.5群 (7/20匹, $P < 0.05$)、MWCNT-N0.25群 (5/20匹)、MWCNT-N0.5群 (3/20匹) でありMWCNT-70.5群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。増殖性病変では、肺胞上皮腺腫の発生頻度は、無処置群 (1/20匹)、対照群 (0/17匹)、FL0.25群 (1/19匹)、FL0.5群 (0/19匹)、FLW0.25群 (1/20匹)、FLW0.5群 (0/18匹)、MWCNT-70.25群 (2/20匹)、MWCNT-70.5群 (2/20匹)、MWCNT-N0.25群 (2/20匹)、MWCNT-N0.5群 (0/20匹) で群間の有意差はなく、肺胞上皮腺癌の発生頻度は、無処置群 (0/20匹)、対照群 (0/17匹)、FL0.25群 (0/19匹)、FL0.5群 (0/19匹)、FLW0.25群 (0/20匹)、FLW0.5群 (0/18匹)、MWCNT-70.25群 (2/20匹)、MWCNT-70.5群 (2/20匹)、MWCNT-N0.25群 (2/20匹)、MWCNT-N0.5群 (3/20匹, $P < 0.05$)、でありMWCNT-N0.5群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。肺胞上皮腺腫と腺癌を合わせた肺腫瘍発生頻度では、無処置群 (1/20匹)、対照群 (0/17匹)、FL0.25群 (1/19匹)、FL0.5群 (0/19匹)、FLW0.25群 (1/20匹)、FLW0.5群 (0/18匹)、MWCNT-70.25群 (4/20匹, $P < 0.05$)、MWCNT-70.5群 (4/20匹, $P < 0.05$)、MWCNT-N0.25群 (4/20匹, $P < 0.05$)、MWCNT-N0.5群 (3/20匹, $P < 0.05$) で、MWCNT-7とMWCNT-Nではいずれの用量においても対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。

(1)-2. 肺内被験物質沈着量の定量 (内木)

TIPS投与後104週後の肺における被験物質の沈着量について、各群3匹を用いて解析した。その結果、FL0.25群 ($0.24 \pm 0.13\mu\text{g}$ 、残存率0.1%)、FL0.5群 ($0.30 \pm 0.33\mu\text{g}$ 、残存率0.1%)、FLW0.25群 ($3.52 \pm 1.05\mu\text{g}$ 、残存率1.4%)、FLW0.5群 ($8.30 \pm 8.03\mu\text{g}$ 、残存率1.7%)、MWCNT-70.25群 ($62.0 \pm 8.2\mu\text{g}$ 、残存率24.8%)、MWCNT-70.5群 ($89.8 \pm 13.5\mu\text{g}$ 、残存率18.0%)、MWCNT-N0.25群 ($142.5 \pm 19.6\mu\text{g}$ 、残存率57.0%)、MWCNT-N0.5群 ($194.2 \pm 29.0\mu\text{g}$ 、残存率38.8%) であった。

(1)-3. 肺酸化ストレスの定量 (梯、内木)

酸化ストレスの指標として、8-OHdGを解析した。FFPE検体を用いた免疫染色で、1,000個あたりの陽性細胞数を計測した結果、無処置群 (2.4 ± 1.3 陽性細胞/1,000細胞) と対照群 (7.0 ± 2.7) の間に明らかな変化はなく、被験物質投与群では、FL0.25群 (5.5 ± 2.3)、FL0.5群 (5.6 ± 2.8)、FLW0.25群 (32.5 ± 32.1)、FLW0.5群 (35.5 ± 31.1)、MWCNT-70.25群 (59.2 ± 16.4 , $P < 0.001$)、MWCNT-70.5群 (60.1 ± 19.7 , $P < 0.001$)、MWCNT-N0.25群 (175.2 ± 60.7 , $P < 0.001$)、MWCNT-N0.5群 (213.8 ± 46.0 , $P < 0.001$) であり、FLおよびFLW投与群では、いずれの用量においても対照群と比較して明らかな肺胞上皮における陽性細胞の増加は見られなかったのに対し、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群では、いずれの用量でも有意な核陽性細胞数の増加を認めた (図1)。

肺凍結組織を用いたELIZA法による8-OHdGの解析は、各群2匹を用いて実施した。その結果、無処置群 ($0.65 \pm 0.01\text{ pg}/\mu\text{gDNA}$) と対照群 ($0.73 \pm 0.00\text{ pg}/\mu\text{gDNA}$) の間に明らかな変化はなく、被験物質投与群では、

FL0.25群 (0.74±0.03 pg/μgDNA)、FL0.5群 (0.66±0.08 pg/μgDNA)、FLW0.25群 (0.66±0.13 pg/μgDNA)、FLW0.5群 (0.64±0.10 pg/μgDNA)、MWCNT-70.25群 (0.75±0.21 pg/μgDNA)、MWCNT-70.5群 (0.55±0.12 pg/μgDNA)、MWCNT-N0.25群 (0.46±0.10 pg/μgDNA)、MWCNT-N0.5群 (4.39±1.85 pg/μgDNA、P<0.05) であり、MWCNT-N高用量で8-OHdGが有意に増加した。

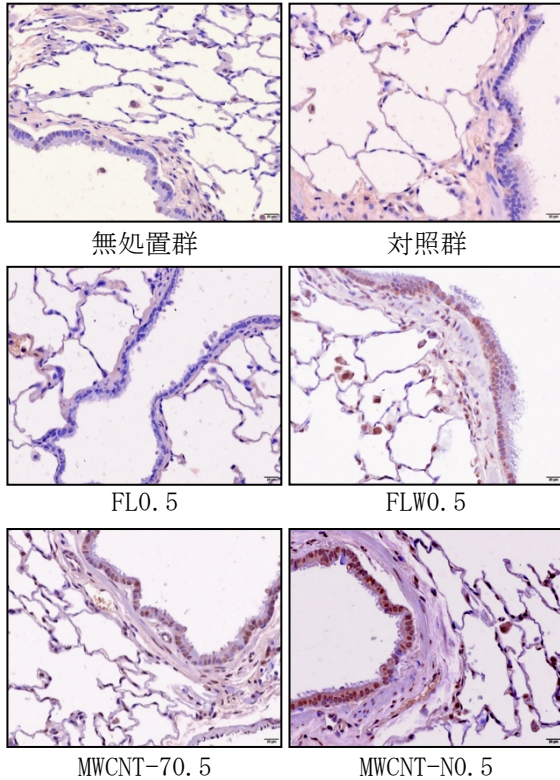


図1. 8-OHdG免疫染色(ラット肺、104週)

(1)-4. NGSによる肺腫瘍の全ゲノム解析(戸塚、内木)
 今年度はまず、MWCNT関連の既存腫瘍サンプル(FPFE)を用い、NGSによる体細胞変異解析を実施することとした。MWCNTをTIPS投与したラット肺の腫瘍および正常部分よりCovaris社のキットであるtruXTRAC FPFE DNA microTUBE Kit-Column Purificationを用いてゲノムDNAの抽出を行い、次世代シーケンサー(NovaSeq)にて全ゲノム解析を行った。しかし、抽出したゲノムDNAは切断が進んでおり、DIN値が極端に低く、解析データを得るに至らなかった。解析に使用したゲノムDNAの状態をバイオアナライザにて確認したところ、特に腫瘍サンプル(T)においてDNAの分解が進んでいることが確認された。現在、NGS解析が可能な、状態の良いゲノムDNAを得る方法を検討している。方法が確立し次第、再度、NGSによる全ゲノム解析を行う予定である。

(2) CNTの物性と発がん性の解析(津田、内木)

TIPS投与するCNTsについて、キャラクターゼーションを行った。線維径は、MWCNT-7は100nm、MWCNT-Nは60nmであり、MWCNT-7の方がより線維径が太いことが確認された。SWCNTの線維径は約3nmで、SEM観察では

束状になっていた(図2)。吸光度分析では、SWCNTが高値を示し、次いでMWCNT-N、MWCNT-7の順に低下した。各CNTの層数はMWCNT-7で約40層、MWCNT-Nで約30層、SWCNTは単層であり、層の少ない順に表面積が大きくなり、吸光度が全体的に高くなったと考えられた。

本年度は、本学医学研究科実験動物研究教育センターに動物実験計画を申請し承認を得た上、実験に必要な動物および動物施設スペースを確保した。またCNTsと既知発がん物質としてのDHPN、NNKについてはTIPS

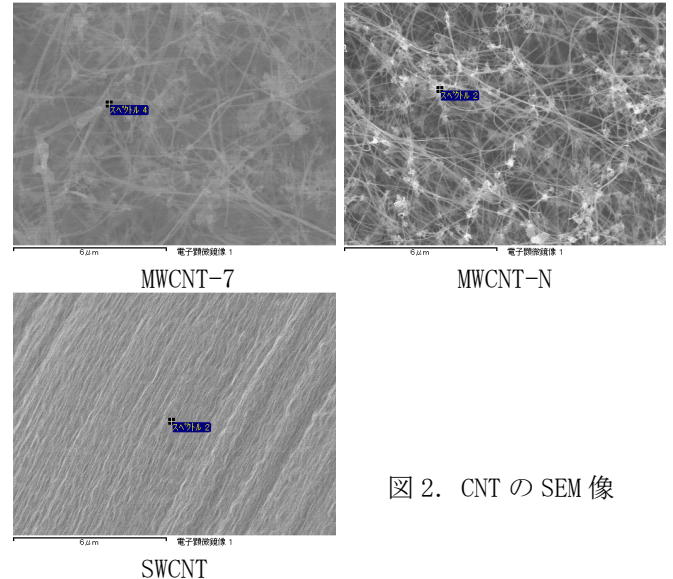


図2. CNTのSEM像

投与を開始し、順調に進行中である。現在、投与後4週のサンプル採取が完了し、研究サンプルの解析を施行している。

(3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析(内木)

現在、マウスMφ細胞(RAW264.7)の培養液中にCNTsを添加し、培養液中のROSレベルおよびMφ細胞の炎症性サイトカインmRNA発現レベルを解析している。CNTによる酸化ストレス誘導の結果から、CNTの物性との関連を検証する予定である。

また使用する肺オルガノイドは、マウス正常肺組織に由来するもので、現在オルガノイドの培地、播種数、培養日数などの培養条件を検討している。CNTの肺毒性を解析するためには、CNTを暴露されたMφ細胞による肺オルガノイドへの作用が重要である。しかしながら、肺オルガノイドはマトリゲル中で3次元培養するため、直接Mφ細胞と共培養するには工夫が必要である。そこで、今年度はまずCNTを暴露し酸化ストレス誘導の程度が明らかになったMφ培養上清を、肺オルガノイドに投与して解析を進める予定である(内木)。肺オルガノイドを用いたNGS解析により、単独の遺伝子変動ではない、全体の遺伝子発現均衡の変動によって変化する生物学的・機能的パスウェイの抽出(遺伝子オントロジー解析)を試み、CNTの毒性として意義のある生体反応や機能を検出する(内木)。

D. 考察

肺発がん性が未知のナノマテリアルであるFLとFLWについて、肺発がん性を示すMWCNT-7やMWCNT-Nを陽性コントロールに設定し、TIPS投与104週（2年）後の肺を解析した。その結果、FLとFLWはMWCNT-7やMWCNT-Nと異なり、肺に対する発がん性を示さないことが明らかになった。短期試験（1週）では、MWCNT-7、MWCNT-NだけでなくFLWにおいても、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺泡マクロファージの増加を認め、一方、肺におけるROS蓄積や*Cc12*、*Cc13*mRNA発現上昇は、MWCNT-7、MWCNT-Nでのみ認めた。肺におけるROSによるDNA損傷は、104週において特に、肺発がん性を認めたMWCNT-NおよびMWCNT-7で有意に多く認められ、CNTによる酸化ストレスとDNA障害が、肺発がんを誘導する可能性が強く示唆された。TIPS投与104週後の肺内被験物質の蓄積量は、MWCNT-7やMWCNT-Nと比較すると、FLWおよびFLWにおいて極めて少なく、MWCNTsと比較して排出しやすいと考えられる。このようなCNTsの排泄の差異が酸化ストレスの誘発や発がん性の有無に関与する可能性も考察する必要があると考えられる。

DNAとROSの反応により形成される付加体である8-OHdGは、酸化DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。本試験において、MWCNT-7又はMWCNT-Nは肺泡上皮腺腫と腺癌の発生頻度を有意に上昇させ、8-OHdGの上昇を伴っている一方、FLやFLWは明らかな発がん性を認めず、8-OHdGは対照群と同様のレベルであることから、肺泡および気管支上皮細胞におけるDNA中における8-OHdG蓄積と肺発がん性に関連していると考えられた。更に、肺泡上皮細胞における酸化ストレスの産生とDNA損傷は、マクロファージによるROS放出の誘導と関連していることが考えられた。

MWCNTをTIPS投与したラット肺FFPEサンプルからゲノムDNAの抽出を行い、次世代シーケンサー（NovaSeq）にて全ゲノム解析を行った。抽出したゲノムDNAの分解・切断が進んでおり、DIN値が極端に低かった原因として、臓器の固定に使用したホルマリンの影響が大きいと考えられた。現在、NGS解析が可能な、状態の良いゲノムDNAを得る方法を検討している。

MWCNTsを暴露させたラット肺腫瘍のNGS解析によりMWCNTに由来する変異シグネチャーが同定された場合、ヒト肺癌や中皮腫のデータ（Bueno R., et al. Nat. Genet. 2016）と比較する予定である。この論文では、99症例（アスベスト暴露の症例を含む）のヒト悪性胸膜中皮腫の全エクソン解析を行っており、得られたデータをNMF解析し、6種類のシグネチャー（S1～S6）を同定している（図3）。このうち、S1はROSに由来、S2は加齢による変異（5-mCの脱アミノ化反応による）由来、S3は喫煙に由来するものとしている。その他肺がん（扁平上皮がん、腺がんなど）で共通に観察されるタバコ由来の変異シグネチャー（S3）が悪性中皮腫で

は観察されていないことが特徴的である（図4）。それ以外では、ROS（S1）および加齢（S2）による変異が寄与している割合が高くなっているが、その他肺がんとの区別が可能な悪性中皮腫に特徴的な変異シグネチャーは見出されていない。また、この論文で見出されたS4、S5、S6のシグネチャーはその由来がわかっていないシグネチャーである。

本研究ではアスベストと形状が類似したMWCNT暴露により動物モデルに作成した腫瘍の全ゲノム解析からその変異シグネチャーを同定する予定である。MWCNTに固有のシグネチャーが同定できた場合には、ヒト中皮腫のシグネチャーとの類似性などについて検討し、これら新規マテリアルがヒト発がんに寄与するかどうかについて検討を行う。また次年度以降には、本年度からTIPS投与を開始している、MWCNT-7、MWCNT-Nを含む、壁層数・形状・長さが様々なCNTsについて、段階的にサンプルが得られ、CNT暴露動物の非腫瘍部分を用いた変異シグネチャーの解析も予定しており、得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

TIPS法は、大規模な吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺、中皮毒性の評価が可能である。これまでのTIPS法による研究の蓄積から、複数のMWCNTsの発がん性が明らかになってきたことを踏まえ、本研究ではまず、TIPS法による研究サンプルを用いて、酸化ストレスやゲノム変化を多段階に解析することにより、CNTのAOPを導き出すことを目指している。とくに亜急性期のサンプルや非腫瘍性のサンプルからも検出されるAOPを得られた場合、*in vitro*系においても毒性指標となりうることから、より短期間で簡便な評価手法に応用できる可能性がある。*In vitro*試験法として、3次元構造のほうが従来の2次元培養よりもより生体に近いと考え、現在、肺オルガノイド培養系を確立していく。ROS、サイトカイン発現およびNGSによるゲノム変化など、*in vivo*解析で見られている毒性指標を解析することで、*in vitro*で連動するものを見出す。

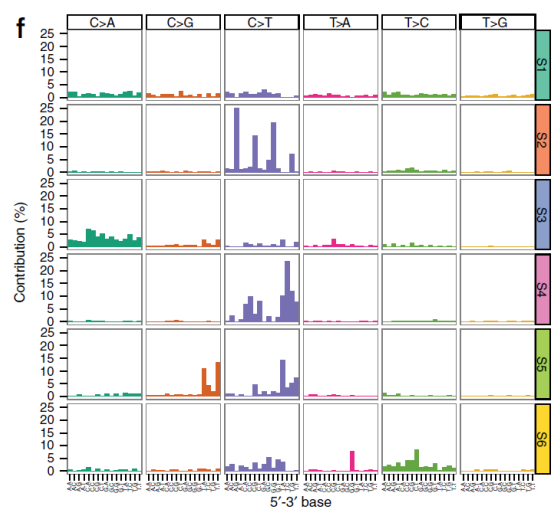


図3. ヒト悪性胸膜中皮腫の全エクソン解析により同定された6種類の変異シグネチャー

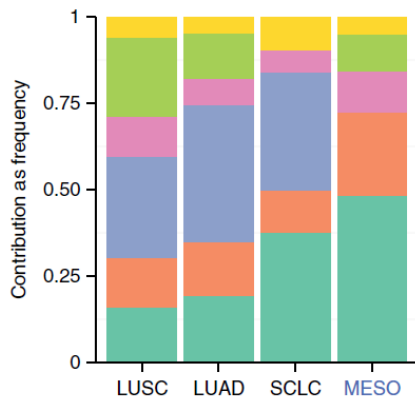


図4. 各種肺がんおよび中皮腫における各変異シグネチャーの分布。LUSC, lung squamous cell carcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; SCLC, small cell lung cancer; MESO, mesothelioma

E. 結論

TIPS法を用いて、FLおよびFLWのF344ラット肺発がん性について検討した。陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nでは肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FLおよびFLW投与群においては、腺腫の発生は認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。投与後104週のラット肺において、MWCNT-7 およびMWCNT-N投与群では、気管支および肺胞上皮細胞の核DNA 8-OHdG形成レベルが上昇し、肺発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化ストレスや8-OHdG形成の誘導が関与していると考えられる。投与後1週間の肺においてもROSレベルの上昇は、MWCNT-7とMWCNT-Nのみに認め、発がん性を示さなかったFLとFLWでは見られなかったことから、ROSはCNT発がんの短期予測指標になりえる可能性があると考えられた。

今年度はまず、MWCNT 関連の既存腫瘍サンプル (FFPE) を使い、NGSによる体細胞変異解析を実施することとした。MWCNTをTIPS投与したラット肺の腫瘍および正常部分よりゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサー解析を行ったが、DNAの分解・切断が進んでおり、解析データを得るに至らなかった。今後、さらにNGS解析が可能な、状態の良いゲノムDNAの抽出方法を検討し、抽出方法が確立し次第、再度NGSによる全ゲノム解析を行う予定である。

本研究の結果、MWCNTに固有のシグネチャーが同定できた場合には、ヒト中皮腫のシグネチャーとの類似性などについて検討し、これら新規材料がヒト発がんに寄与するかどうかについて検討を行う。また、次年度以降ではMWCNT暴露動物の非腫瘍部分を用いた変異シグネチャーの解析も予定しており、得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336:32-38, 2021.
- Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, **Naiki-Ito A**, **Kakehashi A**, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33:279-285, 2020.
- Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 17:48, 2020.
- Tomita N, Hotta Y, **Naiki-Ito A**, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease. *Physiol Rep.* 8:e14556, 2020.
- Naiki-Ito A**, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
- Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, **Naiki-Ito A**, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *NeuroUrol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
- Nozaki S, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
- Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, **Naiki-Ito A**, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 25:2737, 2020.
- Naiki-Ito A**, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 41:1145-1157, 2020.
- Yeewa R, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice

- Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients*. 12: pii: E558, 2020.
11. ○Iida K, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Cancer Sci*. 111:1165-1179, 2020.
 12. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, **Totsuka Y**, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabanjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77, 2021.
 13. **Totsuka Y**, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*, 112, 7-15, 2021.
 14. **Totsuka Y** Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 96:180-187, 2020.
 15. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 33:1907-1914, 2020.
 16. ○Kawanishi M, Yoneda R, **Totsuka Y**, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ*. 42:16, 2020.
 17. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, **Totsuka Y**, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 41:368-376, 2020.
 18. ○**Kakehashi A**, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers*, 13,1216, 2021.
 19. ○**Kakehashi A**, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi, H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci*. 21:7746, 2020.
 20. Sakai A, Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment, *PLoS One*. 15:e0238120, 2020.
 21. ○Fujioka M, Suzuki S, Gi M, **Kakehashi A**, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi, H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*, 94:927-937, 2020.
 22. ○Wang Q, Zhao Z, Alexander DB, Zhao D, Jiegou Xu, **Tsuda H**. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, *J. Toxic. Pathol*. 33:145-151, 2020.
 23. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kurosawa G, Kurosawa Y, Alexander DB, **Tsuda H**, Saga T, Higashi T. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody O67-213has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. *Int. J. Mol. Sci*. 21: 2304, 2020.
2. 学会発表
1. **内木綾**、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智. MiR-8080はandrogen receptorスプライスバリアントの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第109回日本病理学会 (2020年7月、Web開催)
 2. **Aya Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第79回日本癌学会学術総会 (2020年10月、広島)
 3. **内木綾**. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み (A演説)、第66回日本病理学会秋期特別総会 (2020年11月、浜松)
 4. **戸塚ゆ加里**. NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望、第47回日本毒性学会学術年會シンポジウム (2020年6月 Web開催)
 5. **戸塚ゆ加里**. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第27回日本がん予防学術大会 (2020年9月 Web開催)
 6. **戸塚ゆ加里**. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach, 第79回日本癌学会学術総会 (2020年10月、広島)
 7. **戸塚ゆ加里**. 集学的アプローチによりがんの要因を解明する、第2回三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web開催)
 8. **戸塚ゆ加里**. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第49回環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
 9. **梯アンナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2の解明. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2021年1月29日)
 10. **梯アンナ**、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとしてCACHD1の役割. 第79回日本癌学会学術総会 (2020年10月3日)
 10. 魏民、鈴木周五、**梯アンナ**、松江泰佑、鰐淵英機.

有機ヒ素化合物の経胎盤ばく露によるマウス肺発がんにおけるヒストンH3K9メチル化異常の関与。第79回日本癌学会学術総会(2020年10月1日)

11. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機。有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸(DMA)はマウス経胎盤ばく露によりヒストンH3K9修飾を介した肺発がんを促進する。2020年度文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会(2020年9月11日)
12. 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機。ラットにおけるacetoaceto-o- toluidideの膀胱発がん促進作用。第47回日本毒性学会学術年会(2020年6月29日)
13. 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機。芳香族アミンacetoaceto-o- toluidideのラット膀胱発がん性とその機序解明。第93回日本産業衛生学会(2020年6月12日)
14. Saleh D, Alexander TW, Numano T, Ahmed MHO, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Takase H, Naiki-ito A, Takashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. SOT Annual Meeting & ToxExpo (2021年3月、Web開催)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

分担研究課題名：カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーの肺における有害性の比較と有害性指標の検索

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 実験病態病理学 准教授

研究要旨

ナノサイズの金属・カーボン・有機物粒子・繊維状物質は非常に安定であり、吸入された場合は組織・細胞に長期間沈着する。従来の化学物質が、物質自体の代謝変換によって障害や発がんを誘発するのは異なり、ナノマテリアルの障害性及び発がん性には、不可逆的な蓄積とそれに対する慢性的な炎症や異物反応が関与する。申請者らはこれまでに、吸入暴露試験で発がん性を認めた MWCNT-7 を含めた複数のカーボンナノチューブ（CNT）について、経気管肺内噴霧投与方法（TIPS 法）を用いた肺および中皮発がん性の検出に成功した。本研究では、物性の異なる CNTs をモデル物質として、TIPS 投与によるラット肺・胸膜中皮発がん性の有無、および発がん性の程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより求められた CNT の Adverse Outcome Pathway (AOP) を、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的として行う。本年度は、肺発がん性が検出された MWCNT-7、NWCNT-N を陽性対照として、肺発がん性が未知であるフラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）について、TIPS 投与による肺腫瘍性病変の発生と酸化ストレス蓄積について解析した。

その結果、MWCNT-7、MWCNT-N では肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FL および FLW 投与群では腺癌の発生を認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。肺発がん性を示す MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群において、投与後 104 週のみならず、1 週においても肺胞上皮細胞核における活性酸素種（ROS）レベルの上昇が見られたことから、酸化ストレスは CNT による AOP として重要で、発がん機序に強く関与すること、また発がん性の短期予測指標になりえる可能性が示唆された。

現在、MWCNT-7、MWCNT-N を含む、壁層数・形状・長さが様々な CNTs について、TIPS 投与を開始しており、肺・中皮の毒性変化について、急性・亜急性・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて、経時的なサンプルを回収し次第、病理組織、酸化ストレスなど基本的な毒性の定量とともに、NGS による遺伝子発現変化や変異シグネチャーの同定を試みる。また *in vitro* 系として、マウス肺オルガノイドの培養条件を検討しており、TIPS 試験と同様の CNT 暴露による細胞層増殖活性や ROS の変化を解析する。

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECD では、CNT を含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今までに 1 物質（MWCNT-7）が日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法（TIPS 法）を用いた試験デザインを開発し、4 種の MWCNT について肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。しかしながら、CNT の発がん性を規定する Adverse Outcome Pathway (AOP) は明らかにされて

いない。本研究では、CNT や CNT と同様に炭素原子から構成され、発がん性が未知であるフラーレン（FL）およびフラーレンウィスカー（FLW）の TIPS 投与による肺と胸膜中皮に対する障害性および発がん性について定量する。また、CNT の沈着による酸化ストレス誘発と発がん性との相関性を解析することにより、酸化ストレスが CNT の Adverse Outcome Pathway (AOP) に関連するかを検討する。また、CNT の有害性と物性の関連について、発がん期だけでなく、それ以前の亜急性・亜慢性期についても経時的に解析するため、CNTs の TIPS 投与を開始する。

B. 研究方法

(1) TIPS法によるFLおよびFLWの肺発がん性の検証

本年度は、CNTによるAOPを求めるのに最適な解析方法を検討するため、MWCNT-7、MWCNT-N、FLおよびFLWをTIPS投与後、発がん期（104週間）に到達したラットの肺発がん性を解析することにより、発がん性が未知であるFLとFLWの発がん性の有無と酸化ストレスや

遺伝子変化を検証する。

FW、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nは、PFポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ合計投与量が0.25あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与（対照）群を設ける。投与後1週と104週間にイソフルラン深麻酔下にて大動脈より採血屠殺（1週は無処置群、対照群およびFL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nの高用量群から各群5匹、104週は各群20匹）して、肺の急性病変と発がんについて解析する。投与後1週では、対照群と比較して、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、肺重量の有意な増加（いずれも $P < 0.001$ ）、CD68陽性マクロファージの増加（FLW： $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N： $P < 0.001$ ）を認めたが、肺胞内の好中球浸潤、炎症性サイトカイン*Ccl2*および*Ccl3*のmRNA発現レベルと活性酸素種（ROS）蓄積量は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群でのみ対照と比較して有意に上昇した（いずれも $P < 0.001$ ）。急性肺毒性の結果から、ナノチューブ投与による酸化ストレスの誘発は、CNTによる肺毒性、発がん性のKey Eventであり、ゲノム変異の原因や早期発がんマーカーとなる可能性がある。そこで104週目では、TIPS投与した被験物質の肺内沈着量の定量、病理組織学的な腫瘍性病変の定量による発がん性の解析とともに、発がん性に対する酸化ストレスおよびゲノム変異の寄与を検証する。肺内被験物質沈着量は、小片に切り刻んだ肺に対して5%硝酸水溶液を20 mL加え、マイクロ波前処理装置（Multiwave GO, Anton Paar）で溶解しHPLC測定する（LC-10、島津製作所）。酸化ストレスは、ROSによるDNA損傷により蓄積される8-OHdGを指標として、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺標本を用いた免疫染色法（Anti-8OHdG mouse monoclonal Antibody, MOG-100P, JaICA, 日本）により定量解析をする。

(2) CNTの物性と発がん性の解析

上記のMWCNT-7、MWCNT-Nを含む、壁層数・形状・長さが様々なCNTsについて、ラットにTIPS投与することにより、肺および中皮の毒性変化について、亜急性・亜慢性・慢性期・発がん期と観察ポイントを広げて詳細に解析する。12週齢F344雄ラットに各種CNTを4週間に合計が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるようにTIPS投与する。また発がんにおける比較対照として、既知の発がん物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を4000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)を200mg/kgとなるようにした群を設ける。群構成はMWCNT-7、MWCNT-N、SWCNT、DHPN、NNK、無処置、溶媒対照とし、以後無処置にて、投与後4週、13週、52週、および104週に屠殺する。屠殺時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取したのち、採血、胸郭を主体とした主要臓器を採取する。亜急性期（4週）では、FFPEの病理組織学的解析により、炎症、組織障害や増殖活性の変化について解析する。HPLCにより被験物質の肺沈着量を測定する。凍結標本により、*Ccl*等の炎症性サイトカインレベルの定量を行う。ROSの

定量は(1)の手法と同様に免疫染色で確認する。亜慢性期以降の解析では、これらの解析に加えて、FFPEあるいは凍結検体由来ゲノムDNAを用いて、NGSによる全ゲノム解析を行う予定である。

(3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

1. Mφ細胞における毒性解析

マウスMφ細胞（RAW264.7）に、(2)で用いたCNTを投与する（0.5mg/ml、*in vivo* 0.5mg/ラット相当）。マウスMφから産生される炎症性サイトカイン（ELISA、定量的RT-PCR）やROS（DCF-DAアッセイ）を定量する。

2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

本研究で用いる肺オルガノイドは、C57BL/6Jマウス肺から採取する。単層の嚢胞状を呈し幹細胞のほか線毛をもつような分化した細胞から構成される。本年度は、まず肺オルガノイドの至適培養条件を検討する。

（倫理面の配慮）

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換

え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており（H28M-45、医動20-028）、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

C. 研究結果

(1) 肺発がん性に対するFLおよびFLWの影響

(1)-1. 肺腫瘍性病変の定量解析

TIPS投与中の動物死亡により、発がん性の評価は、無処置群（20匹）、対照群（17匹）、FL0.25(mg、以下省略)群（20匹）、FL0.5群（19匹）、FLW0.25群（20匹）、FLW0.5群（18匹）、MWCNT-70.25群（20匹）、MWCNT-70.5群（20匹）、MWCNT-N0.25群（20匹）、MWCNT-N0.5群（20匹）で行った。104週間の観察期間途中で死亡動物が発生したため、最終的に104週では、無処置群（12匹）、対照群（13匹）、FL0.25群（14匹）、FL0.5群（12匹）、FLW0.25群（15匹）、FLW0.5群（13匹）、MWCNT-70.25群（15匹）、MWCNT-70.5群（15匹）、MWCNT-N0.25群（17匹）、MWCNT-N0.5群（12匹）を剖検した。途中死亡例では、自然発生の白血病、皮下腫瘍や甲状腺腫瘍などが死因であった。組織学的には、無処置群、対照群、FL0.5群、FLW0.25群、FLW0.5群とMWCNT-70.25群では明らかな肺病変の発生を認めなかったが、FL0.25群（1/7匹）に肺胞上皮過形成、MWCNT-70.5群（1/5匹）、MWCNT-70.25群（1/3匹）とMWCNT-N0.5群（2/8匹）に肺胞上皮腺癌を認めた。

104 週における剖検例では、体重、臓器重量（肺、肝、腎、脾、脳）を測定し、MWCNT-N0.25 群の全体肺重量、相対肺重量（ $1.74 \pm 0.39\text{g}$, $P < 0.05$, $0.40 \pm 0.08\%$, $P < 0.05$ ）が、対照群（ $1.35 \pm 0.38\text{g}$, $0.31 \pm 0.08\%$ ）と比較して有意に高値であった。その他には有意な変化は認めなかった。肺を組織学的に解析し、途中死亡例と合わせて解析した結果、肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群（0/20 匹）、対照群（1/17 匹）、FL0.25 群（2/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（0/20 匹）、FLW0.5 群（1/18 匹）、MWCNT-70.25 群（4/20 匹）、MWCNT-70.5 群（7/20 匹, $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.25 群（5/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹）であり MWCNT-70.5 群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。増殖性病変では、肺胞上皮腺腫の発生頻度は、無処置群（1/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（1/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（1/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（2/20 匹）、MWCNT-70.5 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.25 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（0/20 匹）で群間の有意差はなく、肺胞上皮腺癌の発生頻度は、無処置群（0/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（0/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（0/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（2/20 匹）、MWCNT-70.5 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.25 群（2/20 匹）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹, $P < 0.05$ ）、であり MWCNT-N0.5 群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。肺胞上皮腺腫と腺癌を合わせた肺腫瘍発生頻度では、無処置群（1/20 匹）、対照群（0/17 匹）、FL0.25 群（1/19 匹）、FL0.5 群（0/19 匹）、FLW0.25 群（1/20 匹）、FLW0.5 群（0/18 匹）、MWCNT-70.25 群（4/20 匹, $P < 0.05$ ）、MWCNT-70.5 群（4/20 匹, $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.25 群（4/20 匹, $P < 0.05$ ）、MWCNT-N0.5 群（3/20 匹, $P < 0.05$ ）で、MWCNT-7 と MWCNT-N ではいずれの用量においても対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた。

(1)-2. 肺内被験物質沈着量の定量

TIPS 投与後 104 週後の肺における被験物質の沈着量について、各群 3 匹を用いて解析した。その結果、FL0.25 群（ $0.24 \pm 0.13\mu\text{g}$ 、残存率 0.1%）、FL0.5 群（ $0.30 \pm 0.33\mu\text{g}$ 、残存率 0.1%）、FLW0.25 群（ $3.52 \pm 1.05\mu\text{g}$ 、残存率 1.4%）、FLW0.5 群（ $8.30 \pm 8.03\mu\text{g}$ 、残存率 1.7%）、MWCNT-70.25 群（ $62.0 \pm 8.2\mu\text{g}$ 、残存率 24.8%）、MWCNT-70.5 群（ $89.8 \pm 13.5\mu\text{g}$ 、残存率 18.0%）、MWCNT-N0.25 群（ $142.5 \pm 19.6\mu\text{g}$ 、残存率 57.0%）、MWCNT-N0.5 群（ $194.2 \pm 29.0\mu\text{g}$ 、残存率 38.8%）であった。

(1)-3. 肺酸化ストレスの定量

酸化ストレスの指標として、8-OHdG を解析した。FPPE 検体を用いた免疫染色では、無処置群と比較して対照群で明らかな変化は認めなかった。被験物質投与群では、FL および FLW 投与群では、いずれの用量においても対照群と比較して明らかな肺胞上皮における陽性細胞の増加は見られなかったのに対し、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、いずれの用量でも有意な核陽性細胞数の増加を認めた（図 1）。

(2) CNT の物性と発がん性の解析

TIPS 投与する CNTs について、キャラクターゼーションを行った。線維径は、MWCNT-7 は 100nm、MWCNT-N は 60nm であり、MWCNT-7 の方がより線維径が太いことが確認された。SWCNT の線維径は約 3nm で、SEM 観察では束状になっていた（図 2）。吸光度分析では、SWCNT

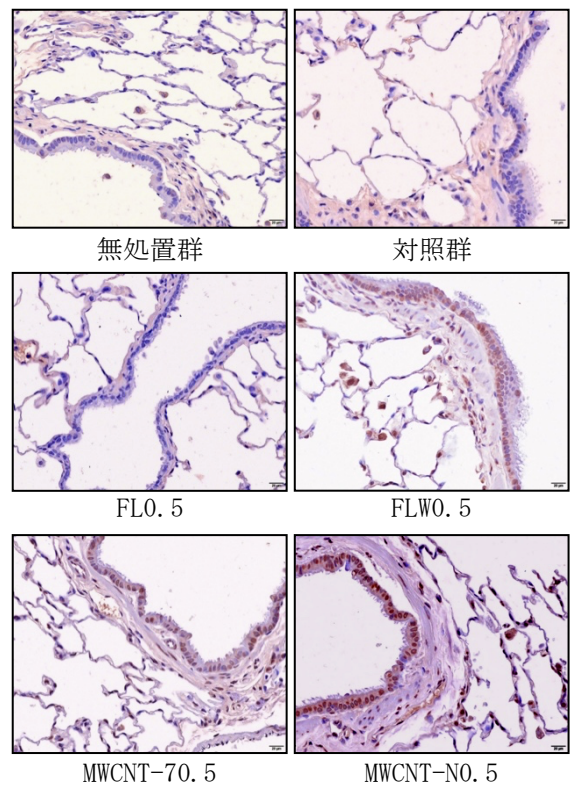


図 1. 8-OHdG 免疫染色（ラット肺、104 週）

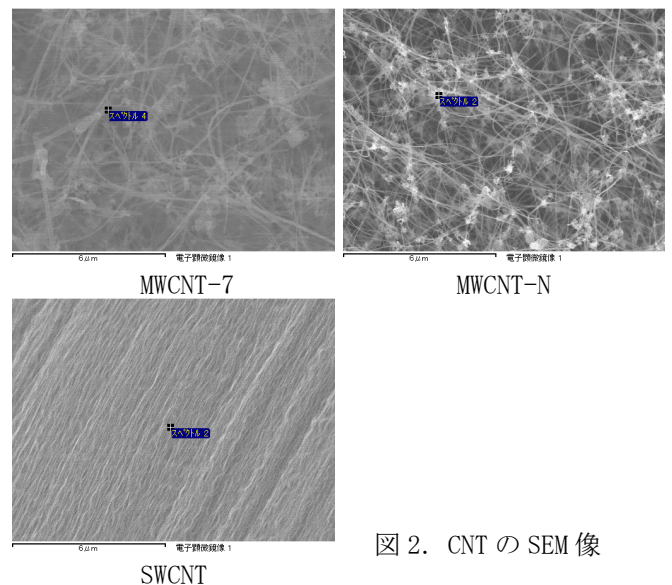


図 2. CNT の SEM 像

が高値を示し、次いで MWCNT-N、MWCNT-7 の順に低下した。各 CNT の層数は MWCNT-7 で約 40 層、MWCNT-N で約 30 層、SWCNT は単層であり、層の少ない順に表面積が大きくなり、吸光度が全体的に高くなったと考えられた。

本年度は、本学医学研究科実験動物研究教育センター

に動物実験計画を申請し承認を得た上、実験に必要な動物および動物施設スペースを確保した。また CNTs と既知発がん物質としての DHPN、NNK については TIPS 投与を開始し、順調に進行中である。現在、投与後 4 週のサンプル採取が完了し、研究サンプルの解析を施行している。

(3) 肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

現在、マウスM ϕ 細胞 (RAW264. 7) の培養液中にCNTs を添加し、培養液中のROSレベルおよびM ϕ 細胞の炎症性サイトカインmRNA発現レベルを解析している。CNT による酸化ストレス誘導の結果から、CNTの物性との関連を検証する予定である。

また使用する肺オルガノイドは、マウス正常肺組織に由来するもので、現在オルガノイドの培地、播種数、培養日数などの培養条件を検討している。CNTの肺毒性を解析するためには、CNTを暴露されたM ϕ 細胞による肺オルガノイドへの作用が重要である。しかしながら、肺オルガノイドはマトリゲル中で3次元培養するため、直接M ϕ 細胞と共培養するには工夫が必要である。そこで、今年度はまずCNTを暴露し酸化ストレス誘導の程度が明らかになったM ϕ 培養上清を、肺オルガノイドに投与して解析を進める予定である。肺オルガノイドを用いたNGS解析により、単独の遺伝子変動ではない、全体の遺伝子発現均衡の変動によって変化する生物学的・機能的パスウェイの抽出(遺伝子オントロジー解析)を試み、CNTの毒性として意義のある生体反応や機能を検出する。

D. 考察

肺発がん性が未知のナノマテリアルであるFLとFLWについて、肺発がん性を示すMWCNT-7やMWCNT-Nを陽性コントロールに設定し、TIPS投与104週(2年)後の肺を解析した。その結果、FLとFLWはMWCNT-7やMWCNT-Nと異なり、肺に対する発がん性を示さないことが明らかになった。短期試験(1週)では、MWCNT-7、MWCNT-NだけでなくFLWにおいても、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺泡マクロファージの増加を認めた。その一方、肺におけるROS蓄積や*Cc12*、*Cc13*mRNA発現上昇は、FLやFLでは見られず、MWCNT-7、MWCNT-Nでのみ認めた。肺におけるROSによるDNA損傷は、104週において、肺腺癌が誘発されたMWCNT-7と-Nで有意に高く、CNTによる酸化ストレスとDNA障害が、肺発がんを誘導する可能性が強く示唆された。TIPS投与104週後の肺内被験物質の蓄積量は、MWCNT-7やMWCNT-Nと比較すると、FLWおよびFLWにおいて極めて少なく、MWCNTsと比較してFLとFLWは排出されやすいと考えられる。このようなCNTsの排泄の差異が酸化ストレスの誘発や発がん性の有無に関与する可能性も考察する必要があると考えられる。

TIPS法は、大規模な吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺、中皮毒性の評価が可能である。これまでのTIPS法による研究の蓄積から、複数のMWCNTsの発がん性が明らかになってきたことを踏まえ、本研究ではまず、TIPS法による研究サンプルを用いて、酸化ストレスやゲノム変化を多段階に解析することに

より、CNTのAOPを導き出すことを目指している。とくに亜急性期のサンプルや非腫瘍性のサンプルからも検出されるAOPを得られた場合、*in vitro*系においても毒性指標となりうることから、より短時間で簡便な評価手法に応用できる可能性がある。*In vitro*試験法として、3次元構造のほうが従来の2次元培養よりもより生体に近いと考え、肺オルガノイド培養系を確立していく。ROS、サイトカイン発現およびNGSによるゲノム変化など、*in vivo*解析で見られている毒性指標を解析することで、*in vitro*で連動するものを見出す。

E. 結論

TIPS法を用いて、FLおよびFLWのF344ラット肺発がん性についてMWCNT-7、MWCNT-Nを陽性対照として検討した。陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nでは肺腺腫、肺癌の発生頻度が有意に上昇した一方、FLおよびFLW投与群においては、腺癌の発生は認めず、肺発がん性を示さないことが明らかとなった。投与後104週のラット肺において、MWCNT-7 およびMWCNT-N投与群では、気管支および肺胞上皮細胞の核DNA 8-OHdG形成レベルが上昇し、肺発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化ストレスや8-OHdG形成の誘導が関与していると考えられる。投与後1週間の肺においてもROSレベルの上昇は、MWCNT-7とMWCNT-Nのみに認め、発がん性を示さなかったFLとFLWでは見られなかったことから、ROSはCNT発がんの短期予測指標になりえる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336:32-38, 2021.
2. ○Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, **Naiki-Ito A**, **Kakehashi A**, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33:279-285, 2020.
3. ○Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 17:48, 2020.
4. Tomita N, Hotta Y, **Naiki-Ito A**, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease. *Physiol Rep.* 8:e14556, 2020.
5. ○**Naiki-Ito A**, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama

- Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
6. Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, **Naiki-Ito A**, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *Neurourol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
 7. Nozaki S, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
 8. Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, **Naiki-Ito A**, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 25:2737, 2020.
 9. ○**Naiki-Ito A**, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 41:1145-1157, 2020.
 10. ○Yeewa R, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 12: pii: E558, 2020.
 11. ○Iida K, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding Author)**, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Cancer Sci.* 111:1165-1179, 2020.

2. 学会発表

1. **内木綾**、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智. MiR-8080はandrogen receptorスプライスバリエーションの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第109回日本病理学会 (2020年7月、Web開催)
2. **Aya Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第79回日本癌学会学術総会 (2020年10月、広島)
3. **内木綾**. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み (A演説)、第66回日本病理学会秋期特別総会 (2020年11月、浜松)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

分担研究課題名：次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム変異解析

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がんモデル開発部門 ユニット長

研究要旨

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。カーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応が誘発される。そのため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー（NGS）によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン（変異シグネチャー）が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性の Adverse Outcome Pathway（AOP）を得ることも可能であることが示されている。今年度はまず、MWCNT 関連の既存腫瘍サンプル（FFPE）を用い、NGSによる体細胞変異解析を実施することとした。MWCNTをTIPS投与したラット肺の腫瘍および正常部分より Covaris 社のキットである truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit-Column Purification を用いて NGS 解析が可能な、状態の良いゲノム DNA の抽出方法を検討している。抽出方法が確立し次第、全ての FFPE サンプルからゲノム DNA を抽出し、NGSによる全ゲノム解析を行う予定である。本研究の結果、MWCNT に固有のシグネチャーが同定できた場合には、ヒト中皮腫のシグネチャーとの類似性などについて検討し、これら新規マテリアルがヒト発がんに寄与するのかどうかについて検討を行う。また、次年度以降では MWCNT 曝露動物の非腫瘍部分を用いた変異シグネチャーの解析も予定しており、得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。カーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応が誘発される。そのため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー（NGS）によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン（変異シグネチャー）が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性の Adverse Outcome Pathway（AOP）を得ることも可能であることが示されている。本研究の目的は複数種類の CNT による遺伝毒性を NGS により解析し、変異シグネチャーの同定とその情報を用いて各種 CNT 安全性の新規手法を構築し、OECD TG に提案できる評価法を開発するものである。

B. 研究方法

今年度は、MWCNT-7 および MWCNT-N を SD ラットに経鼻還肺内噴霧（TIPS）投与を実施し、発生した肺腫瘍サンプルを用いて MWCNT に由来する変異シグネチャーの同定を試みる。ラットに MWCNT-7 で誘発した肺腫瘍（腺がん、N=3）および MWCNT-N で誘発した肺腫瘍（腺がん、N=2）の FFPE サンプルから、腫瘍部分を削り取り、ゲノム DNA を truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit-Column Purification（Covaris）を用いて抽出する。同一個体から非腫瘍部に相当する箇所も削り出し、同様にゲノム DNA を抽出する。抽出したゲノム DNA を次世代シーケンサー（NovaSeq）で全ゲノム解析を行い、腫瘍に検出される体細胞変異の解析を行う。得られたデータを NMF（Nonnegative Matrix Factorization; 非負値行列因子分解）にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う。

（倫理面への配慮）

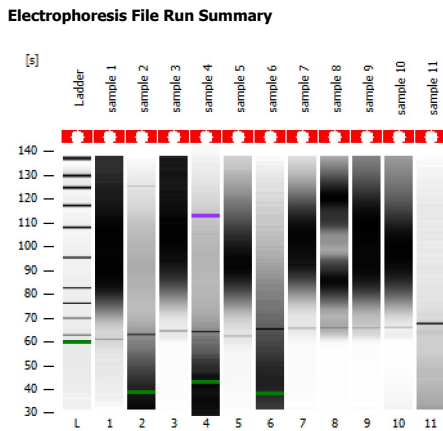
本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研

究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

今年度はまず、MWCNT 関連の既存腫瘍サンプル (FFPE) を用い、NGS による体細胞変異解析を実施することとした。MWCNT を TIPS 投与したラット肺の腫瘍および正常部分より Covaris 社のキットである truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit-Column Purification を用いてゲノム DNA の抽出を行い、次世代シーケンサー (NovaSeq) にて全ゲノム解析を行った。しかし、抽出したゲノム DNA は切断が進んでおり、DIN 値が極端に低く、解析データを得るに至らなかった。解析に使用したゲノム DNA の状態をバイオアナライザにて確認したところ、図 1 のような結果となり、特に腫瘍サンプル (T) において DNA の分解が進んでいることが確認された。現在、NGS 解析が可能な、状態の良いゲノム DNA を得る方法を検討している。方法が確立し次第、再度、NGS による全ゲノム解析を行う予定である。

図 1



D. 考察

MWCNT を TIPS 投与したラット肺の腫瘍および正常部分より Covaris 社のキットである truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit-Column Purification を用いてゲノム DNA の抽出を行い、次世代シーケンサー (NovaSeq) にて全ゲノム解析を行った。しかし、抽出したゲノム DNA は分解・切断が進んでおり、DIN 値が極端に低く、解析データを得るに至らなかった。その原因として、ラットより摘出した臓器の固定に使用したホルマリンの影響が大きいと考えられた。現在、NGS 解析が可能な、状態の良いゲノ

ム DNA を得る方法を検討している。

MWCNT を暴露させたラット肺腫瘍の NGS 解析により MWCNT に由来する変異シグネチャーが同定された場合、ヒト中皮腫のデータ (Bueno R., et al. Nat. Genet. 2016) と比較する予定である。この論文では、99 症例 (アスベスト暴露の症例を含む) のヒト悪性胸膜中皮腫の全エクソン解析を行っており、得られたデータを NMF 解析し、6 種類のシグネチャー (S1~S6) を同定している (図 2)。このうち、S1 は活性酸素種 (ROS) に由来、S2 は加齢による変異 (5-mC の脱アミノ化反応による) 由来、S3 は喫煙に由来するものとしている。その他肺がん (扁平上皮がん、腺がんなど) で共通に観察されるタバコ由来の変異シグネチャー (S3) が悪性中皮腫では観察されていないことが特徴的である (図 3)。それ以外では、ROS (S1) および加齢 (S2) による変異が寄与している割合が高くなっているが、その他肺がんとは区別が可能な悪性中皮腫に特徴的な変異シグネチャーは見出されていない。また、この論文で見出された S4, S5, S6 のシグネチャーはその由来がわかっていないシグネチャーである。

本研究ではアスベストと形状が類似した MWCNT 暴露により動物モデルに作成した腫瘍の全ゲノム解析からその変異シグネチャーを同定する予定である。MWCNT に固有のシグネチャーが同定できた場合には、ヒト中皮腫のシグネチャーとの類似性などについて検討し、これら新規マテリアルがヒト発がんに寄与するかどうかについて検討を行う。また、次年度以降では MWCNT 暴露動物の非腫瘍部分を用いた変異シグネチャーの解析も予定しており、得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

図 2 ヒト悪性胸膜中皮腫の全エクソン解析により同定された 6 種類の変異シグネチャー

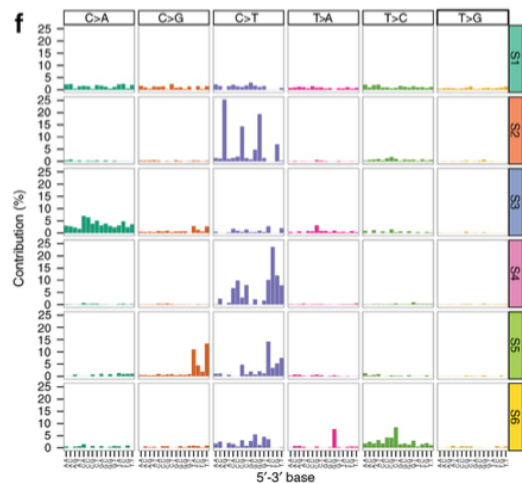
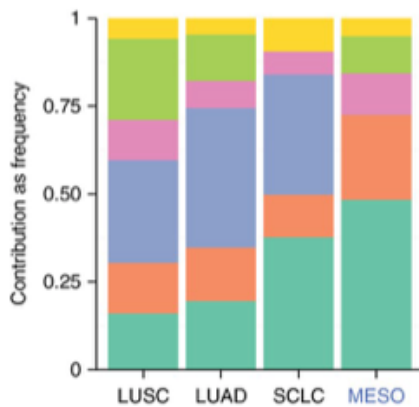


図3 各種肺癌および中皮腫における各変異シグネチャーの分布



E. 結論

今年度はまず、MWCNT 関連の既存腫瘍サンプル (FFPE) を用い、NGS による体細胞変異解析を実施することとした。MWCNT を TIPS 投与したラット肺の腫瘍および正常部分より Covaris 社のキットである truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit-Column Purification を用いて、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析を行ったが、DNA の分解・切断が進んでおり、解析データを得るに至らなかった。今後、さらに NGS 解析が可能な、状態の良いゲノム DNA の抽出方法を検討し、抽出方法が確立し次第、再度 NGS による全ゲノム解析を行う予定である。

本研究の結果、MWCNT に固有のシグネチャーが同定できた場合には、ヒト中皮腫のシグネチャーとの類似性などについて検討し、これら新規マテリアルがヒト発がんに寄与するのかどうかについて検討を行う。また、次年度以降では MWCNT 暴露動物の非腫瘍部分を用いた変異シグネチャーの解析も予定しており、得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, **Totsuka Y**, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. U.S.-Japan cooperative

medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Virology, 555, 71-77, 2021.

- Totsuka Y**, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci, 112, 7-15, 2021.
- Totsuka Y** Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 96:180-187, 2020.
- Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 33:1907-1914, 2020.
- Kawanishi M, Yoneda R, **Totsuka Y**, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. Genes Environ. 42:16, 2020.
- Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, **Totsuka Y**, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. Carcinogenesis. 41:368-376, 2020.

2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里** NGS によるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第 47 回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020 年 6 月 Web 開催)
- 戸塚ゆ加里** 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会 (2020 年 9 月 Web 開催)
- 戸塚ゆ加里** Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by

multidisciplinary approach 第79回癌学会 (2020年10月、広島)

4. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第2回 三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web開催)
5. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回 環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
6. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAア
ダクトーム解析の展望 第37回 日本毒性
病理学会 (2021年1月、Web開催)
戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAア

ダクトーム解析の展望 第12回 JBFシンポジウム (2021年3月、Web開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

分担研究課題名：カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーによる肺内酸化ストレス解析

研究分担者 梶アンナ 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 講師

研究要旨

本研究ではナノマテリアルの肺発がん性メカニズムについて検討し、肺発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的としている。F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与した。ラット肺における免疫染色及び ELISA 法を用いて 8-OHdG の形成レベルを解析した。免疫染色を用いた解析では MWCNT-7 及び MWCNT-N 投与したラット肺の過形成、気管支および肺胞上皮細胞において核 DNA の酸化的損傷マーカー、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルの有意な上昇が認められた。また、FLW 投与群では 8-OHdG 形成レベルの誘導が気管支上皮細胞のみで見られ、上昇傾向が観察された。肺の凍結サンプルを用いた ELISA 法解析では 8-OHdG 形成レベルは MWCNT-N の高用量群でのみ、有意に誘導されていた。本研究では F344 ラット肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い増加が認められ、その二つの CNT において発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや 8-OHdG 形成の誘導が関与していると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアルにはリスクと利益が存在し、そのリスクの程度を知ることが重要である。そのため、毒性を検出する必要があり、吸入暴露試験の代替法は、検査に役立つと思われる。将来、ナノマテリアルの発がん性、特に CNT の発がん性が証明される場合、リスク評価の研究が必要となる。本実験では F344 ラットを用いて *in vivo* 系の実験ではナノマテリアルの発がん性メカニズムについて検討し、肺において発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与した。形成レベルの変化を調べた。

1. ラット肺からの DNA の抽出

ラット左肺サンプル (300 mg) からの DNA の抽出は、以前に報告されている方法を少し改良して行なった¹⁾。簡略に記載すると、核の DNA は、細胞内小器官を溶かすために抗酸化剤 NaI 液を含む DNA Extractor WB kit (和光純薬工業株) を用いて抽出した。更に、細胞溶解の段階における自己酸化を防止するため、deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を細胞溶解剤に添加した。DNA は、nuclease P1 (ヤマサ醤油株、千葉) とアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) によりデオキシヌクレオチドに断片化し、8-OHdG 形成レベルは ELISA 法により測定した。

2. 8-OHdG 形成の測定 (ELISA 法)

左肺から抽出した DNA サンプルにおける高感度 8-OHdG Check ELISA キット (日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所、静岡、日本) を用いてメーカーの説明に従って 8-OHdG 形成レベルを測定した。

3. 免疫組織化学的 8-OHdG 検査

右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色ABC法を用いて8-OHdGの形成レベルを解析した。8-OHdGの免疫染色方法が以前報告されている。肺のパラフィンブロックを3 μ mに薄切した。切片は内因性ペルオキシダーゼをブロックするため0.3%水素水で処理した。馬血清で背景染色をブロッキング処理後、切片は抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体(1:100、日本老化制御研究所製、静岡、日本)をかけて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。

4. 統計処理—試験実施施設

対照群と各投与群との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% (P<0.05) 又は 1%(P<0.01)のレベルで判定した。統計学的解析は、8-OHdG 形成レベル平均値の差について、5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Bartlett' s 法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. ラット肺における8-OHdG形成 (ELISA法で測定)

DNA中における8-OHdG形成の分析結果を図1に示した。ラット肺より抽出したDNAにおける8-OHdGは、0.5 mg/rat MWCNT-N群においてのみ、対照群値と比較して統計学的に有意な増加がみられた。他のナノマテリアルの投与群では8-OHdG形成の上昇が見られなかった。

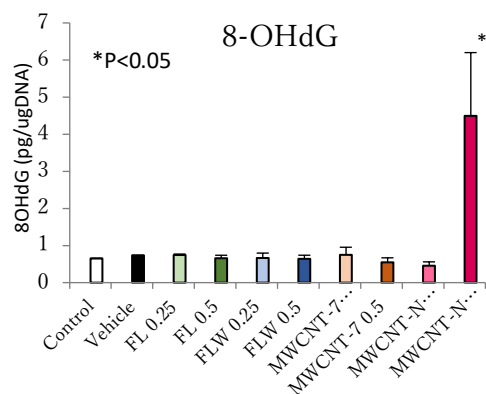


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (ELISA法)

2. ラット肺における8-OHdG形成 (免疫染色で測定)

免疫染色を用いた解析結果は図2と図3に示した。

免疫染色解析では0.25及び0.5 mg/rat MWCNT-7及びMWCNT-Nを投与したラットの肺では8-OHdG形成レベルの有意な上昇が確認された(図2, 3)。MWCNT-7及びMWCNT-N 低用量及び高用量投与群のラット肺過形成、気管支及び肺胞上皮細胞において8-OHdG陽性な細胞が多く見られた。

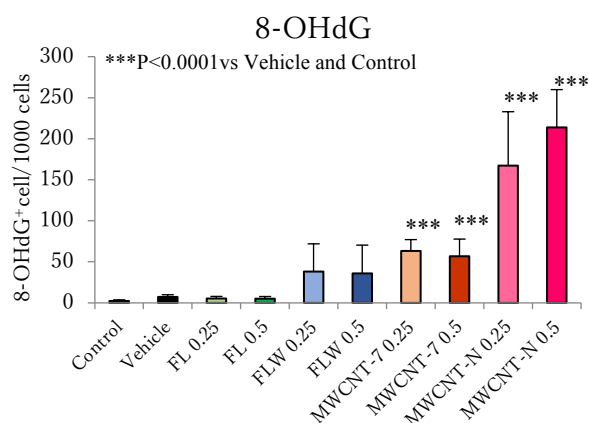


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

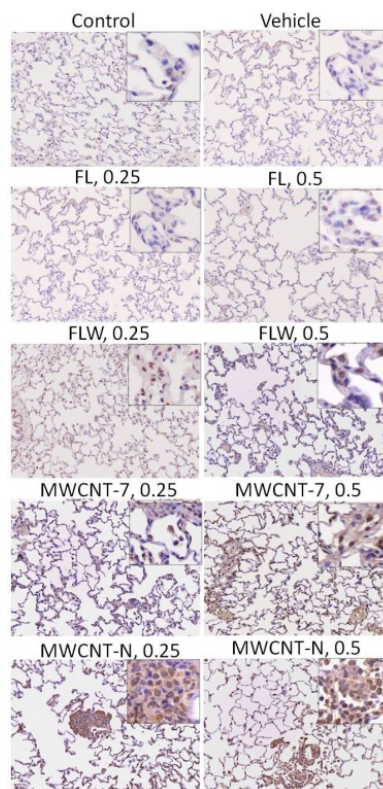


図3. 8-OHdG免疫染色の代表的な写真

FL 0.25及び0.5 mg/rat投与群では8-OHdG形成レベルは対照群値と同等であった。FLW 0.25及び0.5 mg/rat投与群では8-OHdG形成レベルの増加傾向が見られた(図2, 3)。

D. 考察

DNAとROS(活性酸素)の反応により形成される付加体である8-OHdGは、酸化的DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。

本試験において、0.25 および 0.5mg/ml MWCNT-7 又は MWCNT-N を 104 週間投与後、肺腺がんの有意な発生が認められており、肺胞、気管支上皮および肺過形成細胞のDNA中における8-OHdG蓄積に関連していると考えられる。更に、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷は、マクロファージの増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。

E. 結論

F344 ラットの肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では気管支および肺胞上皮細胞の核DNA 8-OHdG形成レベルの強い上昇が認められた。その二つのCNTにおいて発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや8-OHdG形成の誘導が関与していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kakehashi A**, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers*, 13,1216, 2021.
- Kakehashi A**, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V,

Wanibuchi, H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 21:7746, 2020.

3. Sakai A, Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment, *PLoS One*. 15:e0238120, 2020.
4. ○Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, **Naiki-Ito A**, **Kakehashi A**, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33:279-285, 2020.
5. ○Fujioka M, Suzuki S, Gi M, **Kakehashi A**, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi, H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*, 94:927-937, 2020.

2. 学会発表

1. **梯アンナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第37回日本毒理学病理学会総会及び学術集会(2021年1月29日)
2. 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割. 第79回日本癌学会学術総会(2020年10月3日)
3. 魏民、鈴木周五、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物の経胎盤ばく露によるマウス肺発がんにおけるヒストン H3K9 メチル化異常の関与. 第79回日本癌学会学術総会(2020年10月1日)
4. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシ

ン酸(DMA)はマウス経胎盤ばく露によりヒストンH3K9修飾を介した肺発がんを促進する。2020年度文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成

【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会(2020年9月11日)

5. 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機。
ラットにおける acetoaceto-o- toluidide の膀胱発がん促進作用。第47回日本毒性学会学術年会(2020年6月29日)
6. 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機。
芳香族アミン acetoaceto-o- toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明。第93回日本産業衛生学会(2020年6月12日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

研究課題名：ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

分担研究課題名：経気管肺内噴霧投与（TIPS）法によるカーボンナノチューブ有害性の解析

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室・特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

Mohammed Mourad Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程院生

Sivagami Gunasekaran 名古屋市立大学大学院医学研究科研究生

Omnia Hosni Mohamed Ahmed 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究要旨

15層以上の多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）およびチタン酸カリウム線維には肺または胸膜中皮に発がん性のあることを明らかにしてきた。それらは肺内では異物として体内に残留するが代謝分解はされない。一方、ニトロサミン類のような化学発癌物質は生体内で代謝活性化されて最終的にDNA障害をもたらす。MWCNTの発がんリスク評価について両者の発がんにおける遺伝子発現差異を明らかにする。方法はF344雄ラットに剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ線維型（Tangled）のMWCNT-B（肺に発癌性あり）を1回/週にて総投与量1.5mg/ラットをTIPS投与し、肺発がん機序についての比較対照として既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間（計4回）投与した。これらの処置による肺発がんについてRNAマイクロアレイ発現解析、病理所見に関連する遺伝子変化、とくに腫瘍病変における標的シグネチャーを詳細に解析する。結果は国際的に通用するAdverse Outcome Pathway（AOP）を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ（WPMN）に提案できる評価法開発に資するデータの提示をめざす。投与終了後無処置にて6ヶ月経過中でまだ腫瘍の発生には至っていない。

A. 研究目的

形状の異なるMWCNTに対する生体・細胞への障害作用と発がんとその機序を明らかにするために、剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）と、もつれ線維型

（Tangled）のMWCNT-B（肺に発癌性あり）と、既知のニトロソ化合物による急性期ならびに発がん過程における病変について、マイクロRNA、腫瘍については変異シグネチャーに注目した生物学的差異を明らかにする。これによってMWCNTや金属線維による発がん機序において、国際的に通用するAdverse Outcome Pathway（AOP）を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ（WPMN）に提案で

きる評価法を開発する事にある。

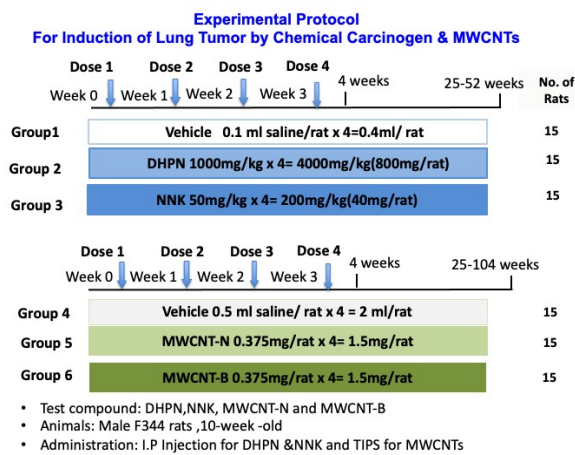
B. 研究方法

津田らが開発してきた経気管肺内噴霧投与

（TIPS）法を用いてF344雄ラットにMWCNT-N、MWCNT-Bを4週間の総投与量1.5mg/ラットを、また発がんにおける比較対照として既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間投与した。投与終了後無処置にて観察中である。現在投与6ヶ月経過中である。

屠殺時には凍結組織から、RNAを精製・抽出する。GeneChip® Clariom D Assay, Rat(Affymetrix社)を用いたマイクロアレイ解析を行う。得られた遺伝子発現データについて、Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Qiagen社)を用いて解析する。得られた腫瘍については変異シグネチャー解析を実施して原因物質による差異を比較して発癌機序の解析に役立てる。

実験デザイン図



(倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)を遵守するとともに、当該法令の規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる研究は行わない。

C. 研究結果

現在4週の結果について、病理組織学的ならびに増殖並びに発がん関連遺伝子等についてマイクロアレイ解析を実施中である。

D. 考察

まだ結果が得られていない。

E. 結論

まだ結果が得られていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Wang Q, Zhao Z, Alexander DB, Zhao D, Jiegou Xu, **Tsuda H**. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, J. Toxic. Pathol. 33:145-151, 2020.
- Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intratracheal instillation in the rat. Part Fibre Toxicol. 17:48, 2020.
- Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kurosawa G, Kurosawa Y, Alexander DB, **Tsuda H**, Saga T, Higashi T. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. Int. J. Mol. Sci. 21: 2304, 2020.

2. 学会発表

- Saleh D, Alexander TW, Numano T, Ahmed MH O, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Takase H, **Naiki-ito A**, Takashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. SOT Annual Meeting & ToxExpo (2021年3月、Web開催)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

- 特許取得
該当なし。
- 実用新案登録
該当なし。
- その他
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S.	Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin.	Toxicol Lett.	336	32-38	2021
Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H.	Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats.	J Toxicol Pathol.	33	279-285	2020
Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H.	Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tapered OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H.	Part Fibre Toxicol.	17	48	2020
Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K.	The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease.	Physiol Rep.	8	e14556	2020

Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S.	A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats.	Arch Toxicol.	94	4085-4097	2020
Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, Naiki-Ito A, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohtayama Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K.	Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation.	NeuroUrol Urodyn.	39	1922-1929	2020
Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T.	Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis.	Andrology.	8	1895-1906	2020
Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P.	Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo.	Molecules.	25	2737	2020
Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S.	Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer.	Carcinogenesis.	41	1145-1157	2020
Yeewa R, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S.	Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism.	Nutrients.	12	pii: E558	2020

Iida K, Naiki T, Naiki A (Corresponding Author), Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S.	Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway.	Cancer Sci.	111	1165-1179	2020
Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildebrand A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Patitongpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim.	Virology.	555	71-77	2021
Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.	112	7-15	2021
Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Waniuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.	96	180-187	2020
Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogasawara K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	33	1907-1914	2020

Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ.	42	16	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles.	Carcinogenesis.	41	368-376	2020
Kakehashi A, Chariya-kornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H.	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers.	13	1216	2021
Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi, H.	Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Int. J. Mol. Sci.	21	7746	2020
Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama- Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S.	Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment.	PLoS One.	15	e0238120	2020
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi, H.	Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model.	Arch Toxicol,	94	927-937	2020

Wang Q, Zhao Z, Alexander DB, Zhao D, Jiegou Xu, Tsuda H.	Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes.	J. Toxic. Pathol.	33	145-151	2020
Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kurosawa G, Kurosawa Y, Alexander DB, Tsuda H, Suga T, Higashi T.	Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression.	Int. J. Mol. Sci.	21	2304	2020

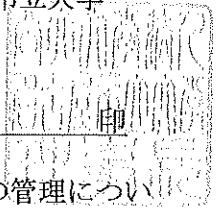
令和3年4月1日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発
- 研究者名 (所属部局・職名) 名古屋市立大学 大学院医学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 内木 綾・(ナイキ アヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

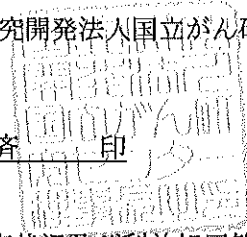
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター
 所属研究機関長 職名 理事長
 氏名 中釜 斉 印



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所 がんモデル開発部門・ユニット長
 (氏名・フリガナ) 戸塚 ゆ加里・ツツカ ユカリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

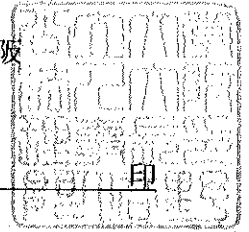
2021年 3月 16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 西澤 良記



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科・講師
(氏名・フリガナ) 梯 アンナ (カケハシ アンナ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

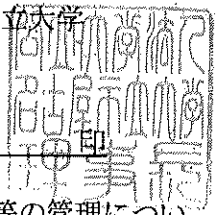
6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学名古屋市立大学
 所属研究機関長 職 名 理事長
 氏 名 郡 健二郎



次の職員の令和 2 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 津田特任教授研究室・特任教授
 (氏名・フリガナ) 津田 洋幸 (ツダ ヒロユキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。