

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価

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

研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用いた遺伝毒性/発がん性予測モデルの構築に取り組んできた。本年度は、これまでの2年間で実施したデータセット (2018 データセットおよび2019 データセット) を統合し、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、当該研究により構築した HRAM-アダクトーム法により検討した。得られた統合データを線形判別分析(LDA)により分類したところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。これらデータを用いて Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018 データセットを単独で用いた場合 (88~94%) と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019 年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019 統合データセットから1被験物質を除いて LDA 解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019 年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018 年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019 年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018 データと2019 データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。今後は、2018+2019 統合データセットの正答率向上について更に検討を行う。また、各グループの予測に重要な付加体の探索やアダクトームデータに化学物質構造データを追加するなど予測精度の向上についても検討する。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測や有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway, AOP) の解析は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を開発することが必要であると考えられる。

我々は、高分解能精密質量分析装置 (HRAM) を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて検討してきた。その結果、トランスジェニックマウスモデルに対して変異原性を示すマグネタイトナノ粒子を気管内投与したマウス肺で、マグネタイトナノ粒子が誘発する G:C→A:T 及び G:C→T:A 変異の基となる付加体 (etheno-dC、 ϵ -dC) を含む複数の付加体形成を確認することを報告した。また、最近では Ames 試験陰性の発がん物質である 1,4-dioxane を投与したラット肝臓に複数の付加体形成が観察され、そのうちの一つは 8-oxodG に相当することを見出した。 ϵ -dC および 8-oxodG はいずれも酸化ストレス・炎症などに伴って形成

される付加体であり、マグネタイトナノ粒子や 1,4-dioxane による変異原性誘発はこれら化学物質の直接的な作用ではなく、宿主反応を介した間接的な作用によることが推測できた。この結果は、アダクトーム法では AOP の取得も可能であり、化学物質の安全性評価手法として有用であることを示唆するものである。

そこで本研究では、アダクトーム法を用いた化学物質の安全性評価法の深化と精度向上、および動物実験代替法への応用開発を目的とする。今年度は、ラットを用いた *in vivo* モデルを用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を HRAM-アダクトームにより検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

B. 研究方法

雄性 SD ラット (各群それぞれ5匹) に遺伝毒性肝発がん物質 (2018年; 9種、2019年; 13種、計22種)、遺伝毒性非発がん物質 (2018年; 3種、2019年; 3種、計5種)、非遺伝毒性肝発がん物質 (2018年; 2種、2019年; 5種、計7種)、非遺伝毒性非肝発がん物質 (2018年; 16種、2019年; 8種、計24種) を投与24時間後に肝臓を摘出した。使用した化学物質は図1に示す。

2018年セット (計30化合物)	2019年セット (計28化合物)
<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodiphenylamine (NDEA), N-Nitrosodiphenylamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP) 遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT) 非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB) 非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP) 	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝毒性ラット肝発がん物質 (+/+): 13種 4,4'-Oxydianiline (44-ODA), Auramine-O (AO), Acid Red 26 (Cl-16150)(AR-26), Benzidine (BZ), Dichloroacetic Acid (DCA), Ethylene thiourea (ETU), Hydrazinium Sulfate (HS), Hydrazine (H2), 4,4'-Methylene-bis[2-chloro-aniline](MBOCA), Nitrososeptamethyleneimine (NMI), Retrosine (RTS), Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB) 遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 2種 2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (DNT), Isonicotinic Acid Hydrazide (INH) 非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarine (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Heptachlorobenzene (HCB) 非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPR), furazemide (FUR), Methylidopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)
陽性対照 2-Nitropropane (2-NP)	陰性対照 Methyl cellulose (MC)

図1 使用した化学物質

DNAを抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼP1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MSに供しDNA付加体の網羅解析を行った。得られたデータはSCIEX社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT)を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを線形判別分析(LDA)により解析した。

次に、得られたデータから、対照群である2-NPおよびMCを除いたデータを用いた。実際に予測モデルを使用する場合は遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。

(倫理面の配慮)

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

各種化学物質を投与したラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図2に示す。LDA解析を行なったところ、2018データセット単独、2019データセット単独、及び2018+2019データセットのいずれにおいても、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグル

ープに明確に分離されることがわかった。

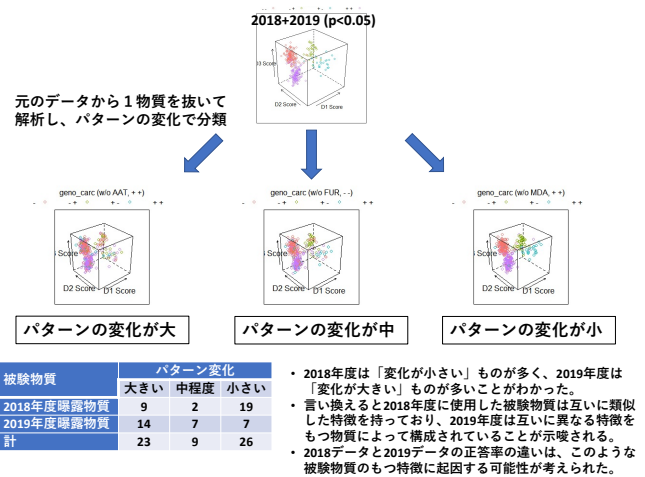


図2 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

表2 遺伝毒性の予測結果

データセット	毒性予測モデルの精度評価の比較		
	Geno/Carcino 正解率 (%)	Geno 正解率 (%)	Carcino 正解率 (%)
2018	88	88	94
2019	38	41	60
2018+2019	49	50	65

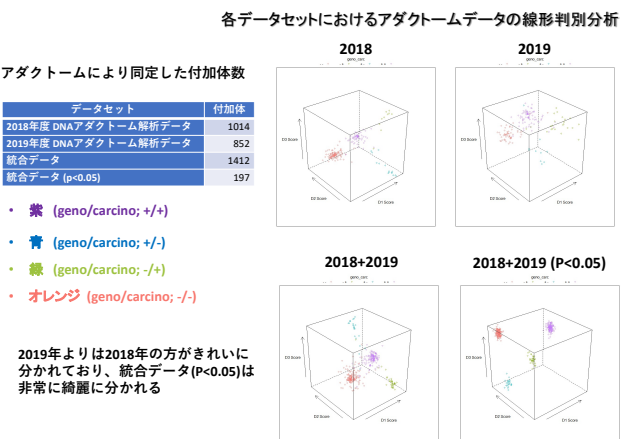


図3 2018+2019統合データセットから1被験物質を除いたLDA解析

Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(ランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2018+2019統合データセットに対して予測を行ったところ、遺伝毒性/肝発がん性の予測結果は49%、遺伝毒性の予測結果が50%、肝発がん性の予測結果は65%と2018年データセット単独の結果と比べ正答率が低くなった(表2)。これは2019年データセットでの正答率が極端に低いことが大きく影響していると考えられた。

2018+2019統合データセットから1被験物質を除いて

LDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった(図3)。

D. 考察

HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行ないLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータを用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。今後は、2018+2019統合データセットの正答率向上について更に検討を行う。また、各グループの予測に重要な付加体の探索やアダクトームデータに化学物質構造データを追加するなど予測精度の向上についても検討する。

E. 結論

58種の遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。得られたデータのLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータを用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。2018+2019統合データセットから1被験物質を除いてLDA解析を行ない、そのパターンの変化の大・中・小で分類を行なってみたところ、2019年に試験した被験物質に変化の大きなものが多数存在することがわかった。このことは、2018年度に使用した被験物質は互いに類似した特徴を持っており、2019年度は互いに異なる特徴をもつ物質によって構成されていることが示唆される。2018データと2019データの正答率の違いは、このような被験物質のもつ特徴に起因する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of

DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 7-15.

- 2) 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, Jantarabekul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, 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.* 2021; 555: 71-7.
- 3) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, 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.* 2020; 96: 180-7.
- 4) 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.* 2020; 41: 368-76.
- 5) 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.* 2020; 42: 16.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 7) 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