

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）

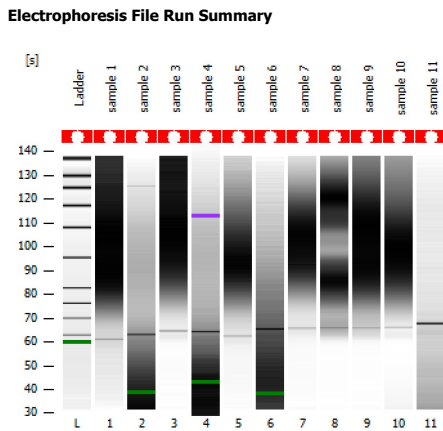
本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研

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

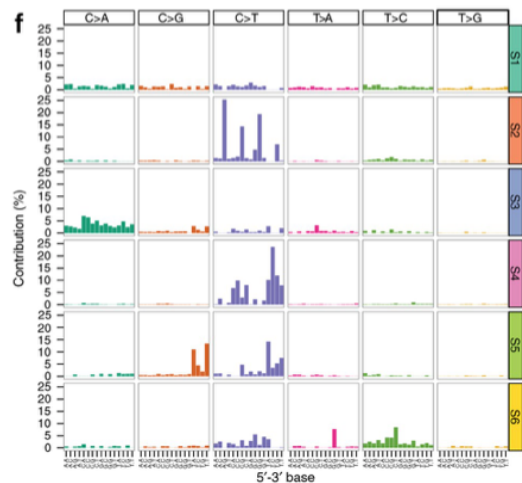
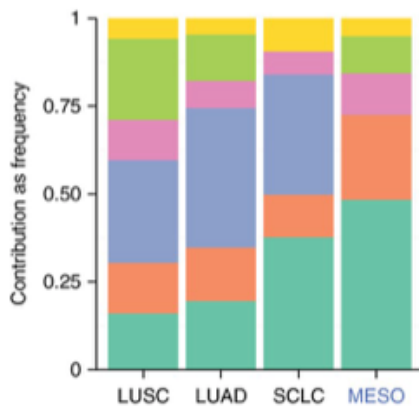


図3 各種肺癌および中皮腫における各変異シグネチャーの分布



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、これら新規材料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。