

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 (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FFPE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、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 (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、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 (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 ( $2.4 \pm 1.3$ 陽性細胞/1,000細胞) と対照群 ( $7.0 \pm 2.7$ ) の間に明らかな変化はなく、被験物質投与群では、FL0.25群 ( $5.5 \pm 2.3$ )、FL0.5群 ( $5.6 \pm 2.8$ )、FLW0.25群 ( $32.5 \pm 32.1$ )、FLW0.5群 ( $35.5 \pm 31.1$ )、MWCNT-70.25群 ( $59.2 \pm 16.4$ ,  $P < 0.001$ )、MWCNT-70.5群 ( $60.1 \pm 19.7$ ,  $P < 0.001$ )、MWCNT-N0.25群 ( $175.2 \pm 60.7$ ,  $P < 0.001$ )、MWCNT-N0.5群 ( $213.8 \pm 46.0$ ,  $P < 0.001$ ) 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。

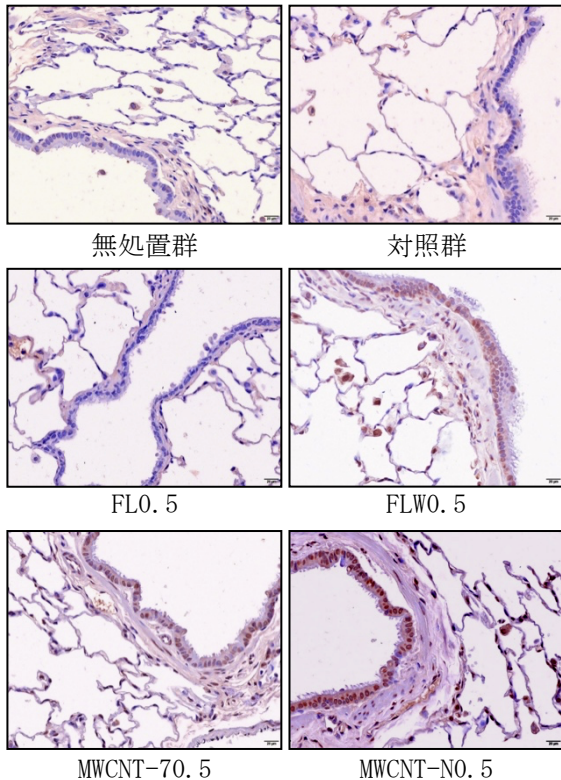


図1. 8-OHdG免疫染色(ラット肺、104週)

(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

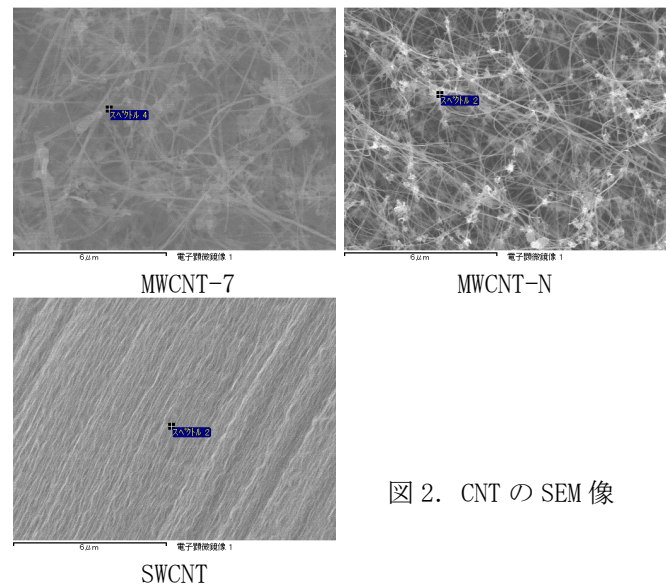


図2. CNTのSEM像

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でのみ認められた。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の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。

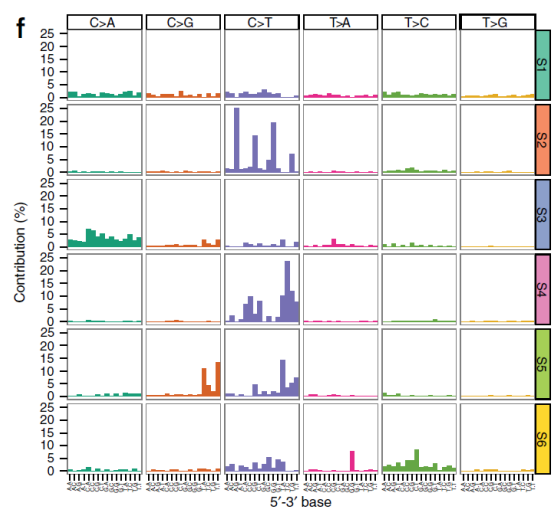


図3. ヒト悪性胸膜中皮腫の全エクソン解析により同定された6種類の変異シグネチャー

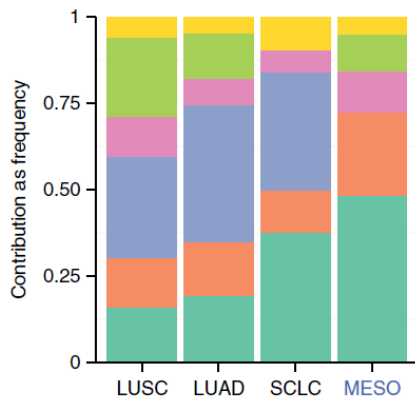


図4. 各種肺がんおよび中皮腫における各変異シグネチャーの分布。LUSC, lung squamous cell carcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; SCLC, small cell lung cancer; MESO, mesothelioma

## 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  $\gamma$ -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, Jantarabjenjakul 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。