

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 日本大学薬学部 教授

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、環境要因の曝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。昨年度はまず、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 を用いて DNA の抽出を試みたが、NGS 解析が可能な、状態の良いゲノム DNA の抽出に至らなかった。今年度はホルマリンによる固定時間の短い CNT 誘発ラット中皮腫の FFPE サンプルを用い、上記方法で DNA の抽出を行った。その結果、問題なく NGS 解析が行えたため、サンプル数を増やして DNA を抽出した。現在、NGS による全ゲノム解析を行っている。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、環境要因の曝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

MWCNT を SD ラットに経気管肺内噴霧（TIPS）投与を実施し、発生した中皮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 を TIPS 投与し誘発した中皮腫の 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（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

ラットにMWCNTをTIPS投与し誘発した中皮腫のFFPEサンプル2検体から腫瘍/非腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用いて抽出した。ゲノムDNAのQCを行ったところ、ゲノム分解度の客観的評価(DIN)値は依然として低く、DNAが分解していることがわかったが、昨年度のサンプルよりかはDIN値が高く(図1)、サンプルの平均長も566-988bpと断片長を保っていた(図2)。これらのサンプルよりライブラリを調製し、NGSによる全ゲノムシーケンスを行ったところ、問題なく解析が行われていることを確認できた。

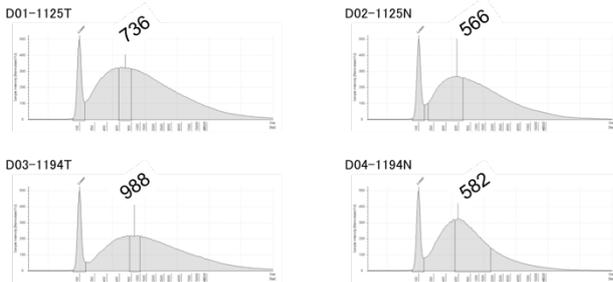
図1

■ Genome DNA/cf DNA

Sample ID	濃度 (ng/μL)	A260/A280	dsDNA濃度 (ng/μL)	ゲノムDNA分解度の客観的評価	QC後の Total volume (μL)	QC後の dsDNA量 (ng)
D01-1125T	328.881	1.841	170	2.1	75	12750
D02-1125N	150.398	1.835	72.8	2	30	2184
D03-1194T	746.842	1.842	364	2.4	75	27300
D04-1194N	446.83	1.9	141	1.8	65	9165

図2

■ 泳動結果



この結果を受け、残りのサンプル3例(腫瘍/非腫瘍部)のゲノムDNA抽出を上記と同じ方法で行い、ライブラリを調製した(図3, 4)。

図3

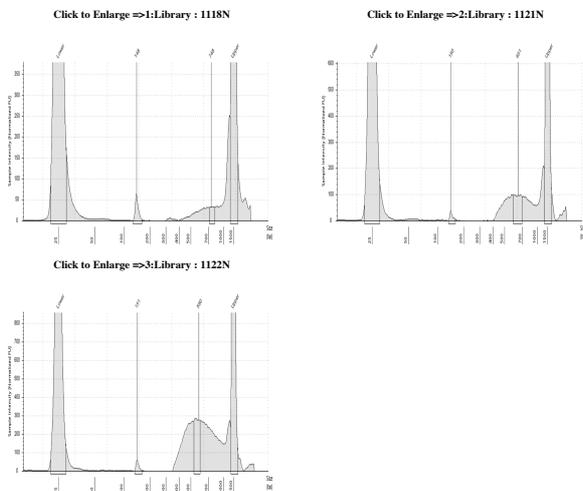
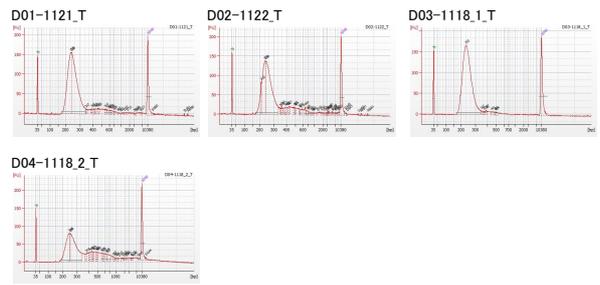


図4



現在、3例についてのNGSによる全ゲノム解析を行っている。全サンプルの解析が終了し次第、変異検出および変異シグネチャーの同定を試みる予定である。

D. 考察

昨年度、MWCNT関連の既存腫瘍サンプル(FFPE)を用い、ゲノムDNAを抽出し、NGS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。これはホルマリン固定による影響であったと考えられたため、今回、ホルマリンの固定時間の短いサンプルを用いたところ、DIN値の上昇が見られ、NGS解析可能なゲノムDNAを得ることができた。現在、残りのサンプルのゲノムDNAの抽出、ライブラリ調製が終了し、NGS解析を行っている。

MWCNTを曝露させたラット中皮腫のNGS解析により、MWCNTに由来する変異シグネチャーが同定することができたら、アスベスト曝露の症例を含む99例の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。本研究で用いているMWCNTはアスベストと形状が類似しており、MWCNT固有の変異シグネチャーが同定できた場合、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否かについて検討を行うことができると考える。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行い、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。

E. 結論

昨年度に引き続き、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投与したラット胸膜の腫瘍および正常部分の既存サンプルより、ホルマリン固定時間の短いサンプルを選び、Covaris社のキットであるtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kitを用いて、ゲノムDNAを抽出したところ、DIN値の改善が見られたことから、次世代シーケンサ

一解析を行い、問題なく解析が行われたことが確認できた。現在、残りのサンプルのゲノムDNAの抽出が終了し、NGS解析を行っている。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, **Totsuka Y**, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer. *In Vivo*. Mar-Apr;36(2): 628-634, 2022.
2. Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, **Totsuka Y**. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids. *Front Genet*. 18:768781, 2021.
3. Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, **Totsuka Y**, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo*. 35:2107-2114, 2021.
4. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 34:912-919, 2021.
5. **Totsuka Y**, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*. 112, 7-15, 2021.

2. 学会発表

1. **戸塚ゆ加里** 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第81回分析化学討論会 (2021年5月 Web開催)
2. **戸塚ゆ加里** DNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第144回日本薬理学会関東支部会 (2021年6月 Web開催)
3. **戸塚ゆ加里** Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 第80回日本癌学会学術総会 (2021年10月、横浜/ハイブリッド開催)
4. **戸塚ゆ加里** 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価 第50回環境変異原学会 (2021年11月、横須賀)
5. **戸塚ゆ加里** ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する 第95回日本薬理学会 (2022年3月、福岡)
6. **戸塚ゆ加里** ナノマテリアルに特化した新規in vitro生体模倣評価系の開発 日本薬学会第142年会 (2022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。