

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、吸入されると組織・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 投与方法によるラット肺・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。

R2 年度には肺発がん陽性対照である多層 CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N) と、肺発がん性未知のフラーレン (FL)、フラーレンウィスカー (FLW) の TIPS 投与方法による肺腫瘍性病変と酸化的 DNA 損傷を解析した。MWCNT-7、MWCNT-N 投与方法により肺腺癌が発生する条件において、FL および FLW では肺腫瘍性病変は発生せず、肺発がん性を示さないことと、104 週における肺発がん性と酸化的 DNA 損傷マーカー (8-OHdG) 発現が相関することが明らかになった。本年度は、TIPS 投与方法による MWCNT-7、MWCNT-N と肺発がん性未知の単層 CNT (SWCNT) による *in vivo* 肺、胸膜有害性・発がん性試験を開始し、経時的に、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こととした。これまでに、亜急性 (4 週) および亜慢性 (13 週) 毒性についてサンプルを回収し解析した。その結果、MWCNT-7、MWCNT-N 投与方法により、肺胞上皮の 8-OHdG 形成レベルと DNA 損傷マーカー陽性率が有意に上昇し、肺胞上皮および胸膜中皮の増殖活性が増加したのに対し、SWCNT による有意な変化は見られなかった。また肺におけるケモカイン (Ccl2、Ccl3、Ccl9) mRNA 発現は、それらの因子と相関して変動した。*In vitro* においても、MWCNTs はマクロファージによる活性酸素種の産生を誘導するのにに対し、SWCNT では誘導されなかった。以上より、酸化的 DNA 損傷と細胞増殖活性化は 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、*in vivo* 試験は順調に経過中で、引き続き慢性期・発がん期についても解析する。またさらなる有害性指標となりえる遺伝子候補を追求するべく、亜急性、亜慢性期の肺サンプルを用いて RNA シーケンシング解析中で、本年度中に解析結果が得られる予定である。*In vitro* 試験では、*in vivo* 試験で有用であった指標について、肺オルガノイドの培養条件を検討し、CNT 暴露による毒性変化を解析している。また CNT の AOP または発がん要因の解明に有用と考えられる変異シグネチャーについては、既存の MWCNT-7 誘発ラット胸膜中皮腫サンプル (FFPE) を用いて、解析を進めている。現在ゲノム DNA の抽出が終了し、今年度中に全ゲノム解析を実施する。これにより変異シグネチャー解析の方法が確立し、次年度以降は今後得られる予定の CNT あるいは既知の発癌物質誘発腫瘍組織や、今年度までに採取した腫瘍発生前組織を用いた解析を進める。

研究分担者

戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部 教授
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。

本年度は、多層CNTs(MWCNT-7, MWCNT-N)と単層CNT(SWCNT)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、酸化的DNA障害、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析する。またNGSによりCNT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、発がんに寄与する責任因子を推定することが可能であると考えられる。また、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を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*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) *In vivo* 実験: TIPS投与によるCNT負荷試験と有害性の解析(梯、津田、内木)

MWCNT-7、MWCNT-NとSWCNT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0.1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。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量のみで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する(1物質77匹:4週(10匹)、13週(7匹)、52週(10匹×2)、104週(20匹×2))。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質(総タンパク、アルブミン)解析に供する(内木・津田)。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、マクロファージ(M ϕ)局在(抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性(抗Ki67抗体、Abcam)、アポトーシス(TUNEL、タカラバイオ)やDNA損傷(抗 γ H2AX抗体、CST)の程度について免疫組織学的に解析する(内木)。また酸化ストレスは、ROSによるDNA損傷により蓄積される8-OHdGを指標として、ブアン固定パラフィン包埋肺標本を用いた免疫染色法(抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体、日本老化制御研究所)により定量解析をする(梯)。右肺の一部から1-2mm角の組織片を切り出し、2%グルタルアルデヒドで固定し、透過電子顕微鏡(TEM)によるCNT観察に用いる。左肺は凍結し、RNA抽出(ISOGEN、ニッポンジーン)と定量的RT-PCRによりCCL種、IL種等の炎症性サイトカイン発現を定量する(内木)。さらにNGSを用いたRNAシーケンシング解析(マクロジェン)に用いる(内木)。

(2) *In vivo* 実験: NGSによるCNT変異シグネチャー解析(戸塚、内木)

MWCNT-7のTIPS投与により雄F344ラット胸膜に発生した、既存の中皮腫サンプルを用いて、MWCNTに由来する変異シグネチャーの同定を試みる。中皮腫のFFPEサンプルを薄切し、組織像を確認し、腫瘍領域を選択する(内木)。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(戸塚)。同一個体の非腫瘍部に相当する組織(心あるいは肝)からも同様にゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAを用いて、NGS(NovaSeq)により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(戸塚)。

本研究では、CNTによる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4,000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)を200mg/kgの用量で、1回/週にて4週間(計4回)投与し、雄F344ラット肺に腫瘍を誘発する。変異シグネチャーの解析方法が確立した後、得られた化学発癌による腫瘍組織と(1)のCNT誘発腫瘍組織を用いて解析する。

(3) *In vitro*実験: M ϕ 細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析(内木)

1. M ϕ 細胞における毒性解析

マウスM ϕ 細胞(RAW264.7)に、(1)で用いたCNTsを投与し(25-100 μ g/ml)、48時間培養する。マウスM ϕ 細胞の細胞生存率(WST-1、ロッシュ)、産生される炎症性サイトカイン(定量的RT-PCR)やROS(DCF-DAアッセイ、サーモフィッシュサイエンティフィック)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。このオルガノイド培養は、マトリゲル(Corning)コート上に、増殖因子含有培地下に播種し、さらにマトリゲルを重層化することにより行う。この方法は、肺オルガノイドに対する被験物質の投与に制限をきたす可能性があるため、肺オルガノイドの最適培養条件を検討する(内木)。(3)-1のCNT処理マウスM ϕ 細胞培養上清を、肺オルガノイドに48時間暴露する。細胞生存率や炎症性サイトカインのmRNA発現解析を行う(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（医動20-028）、当施設での動物実験規程遵守し、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) *In vivo* 実験：CNTによる肺・中皮有害性の解析

(1)-1. CNTによる臓器重量の変化

4週、13週、いずれにおいても、増殖活性、酸化ストレス、DNA障害やアポトーシスについて、免疫染色による定量解析を行った。その結果、肺胞上皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、増殖活性の亢進が見られた一方、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった（図2）。MWCNT-7、MWCNT-N投与により、8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた。SWCNT投与群において、8-OHdG陽性細胞が観察されたが、無処置群、対処群に対して有意な増加は認められなかった（図3）。 γ H2AX標識率は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で高い傾向があり、4週ではいずれにおいても、13週ではMWCNT-Nに有意な上昇を見た（図4）。TUNEL染色では、4週においてMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に陽性率が高く、SWCNTに変化は見られなかった。13週ではCNT投与群で高い傾向があったが、個体差が大きく有意差は認めなかった（図5）。

(1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞M ϕ 誘導と沈着

4週、13週、いずれにおいても、CD68免疫染色により、CNT投与群では対照群と比較して肺胞M ϕ が有意に誘導された（MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTいずれも $P < 0.001$ ）。偏光顕微鏡により肺胞M ϕ に貪食される形でMWCNT-7、MWCNT-NとSWCNTを認めた。SWCNT投与群では好中球浸潤を高度に伴っていた。電子顕微鏡（TEM）観察において、CNTsの線径は、MWCNT-7（ 76.3 ± 25.2 nm）、MWCNT-N（ 46.6 ± 11.7 nm）であり、SWCNTは検出不可であった（図1、参考資料では3nm）。

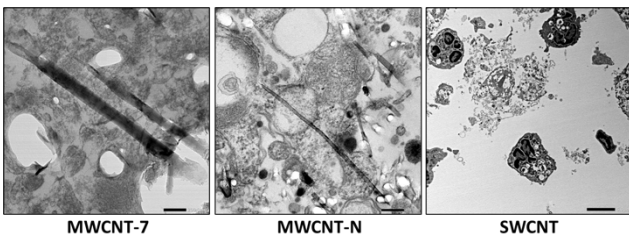


図1. 肺胞M ϕ によるCNTの貪食（TEM像）。

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析

4週、13週、いずれにおいても、増殖活性、酸化ストレス、DNA障害やアポトーシスについて、免疫染色による定量解析を行った。その結果、肺胞上皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、増殖活性の亢進が見られた一方、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった（図2）。MWCNT-7、MWCNT-N投与により、8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた。SWCNT投与群において、8-OHdG陽性細胞が観察されたが、無処置群、対処群に対して有意な増加は認められなかった（図3）。 γ H2AX標識率は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で高い傾向があり、4週ではいずれにおいても、13週ではMWCNT-Nに有意な上昇を見た（図4）。TUNEL染色では、4週においてMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に陽性率が高く、SWCNTに変化は見られなかった。13週ではCNT投与群で高い傾向があったが、個体差が大きく有意差は認めなかった（図5）。

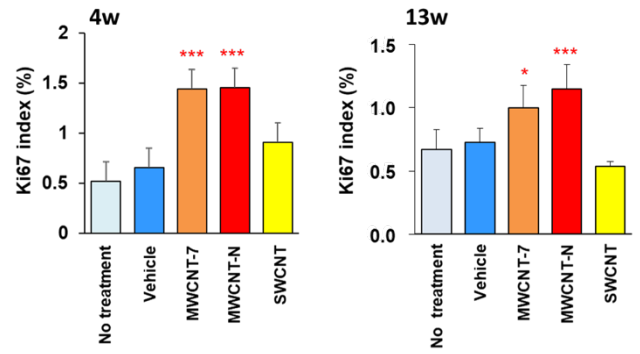


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化（Ki67免疫染色）、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle。

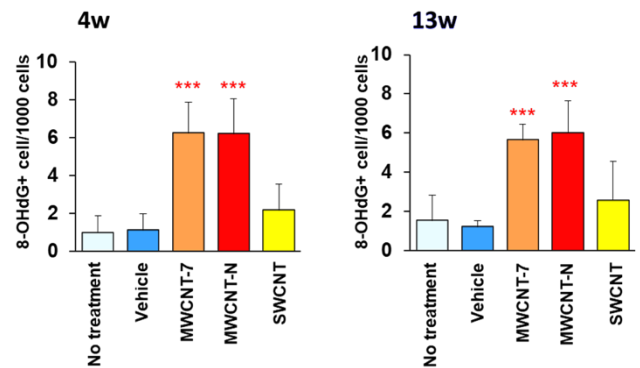


図3. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化（8-OHdG免疫染色）、*** $P < 0.001$ vs Vehicle。

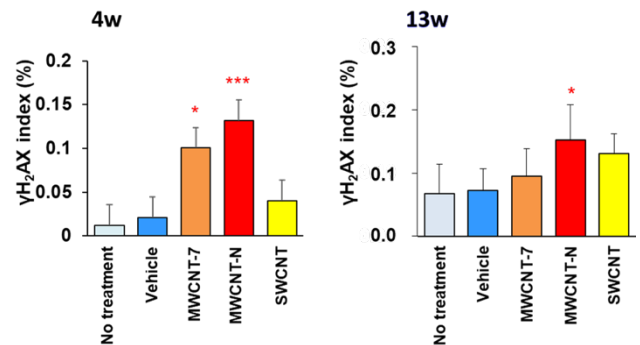


図4. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化（ γ H2AX免疫染色）、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle。

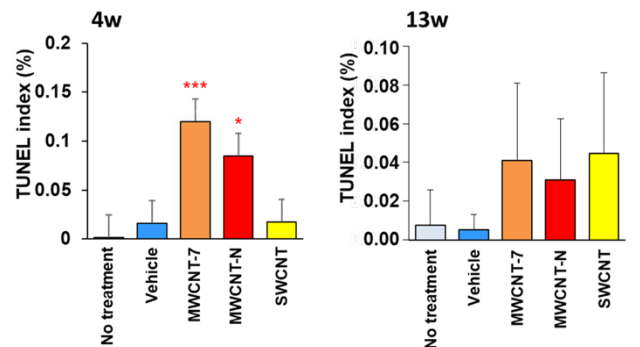


図5. CNT投与による肺胞上皮アポトーシスの変化（TUNEL染色）、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle。

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

4週に採取した胸腔洗浄液や心組織を用いて、胸膜中皮細胞の有害性を解析した。胸腔洗浄液における総タンパクおよびアルブミン値について、無処置群（それぞれ25.9±3.5mg/dl、73.0±6.3μg/ml）、対照群（23.8±5.2mg/dl、66.5±12.1μg/ml）と比較して、MWCNT-N（39.9±9.6mg/dl、P<0.05、96.0±19.1μg/ml、P<0.05）で有意に増加した。MWCNT-7（34.6±8.7mg/dl、86.0±19.0μg/ml）とSWCNT（28.6±4.5mg/dl、76.5±10.6μg/ml）では有意な変化は見られなかった。胸腔洗浄液中のMφ量は、群間で有意差を認めなかった。心膜中皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった（図6A）。γH2AX標識率には有意な変化を認めなかった。

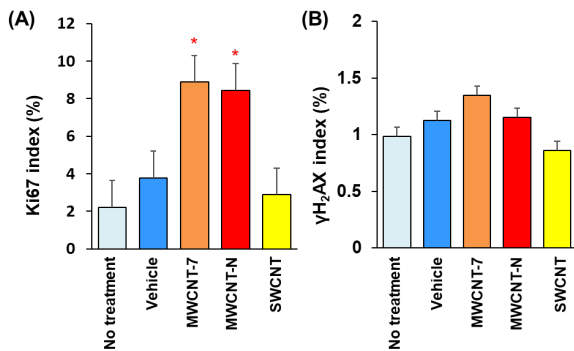


図6. CNT投与による心膜中皮細胞の(A)増殖活性 (Ki67免疫染色) と(B) DNA障害 (γH2AX免疫染色) の変化、4週、*P < 0.05 vs Vehicle。

(1)-5. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

肺におけるサイトカインmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。4週では、Ccl2、Ccl3mRNA発現は、CNTs投与群でいずれにおいても有意に上昇した。Ccl9発現は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に高く、SWCNTでは明らかな変化を認めなかった。Tnf-α、Il-1βやTgf-βでは、CNT投与に特異的な発現変動を示さなかったが、Tnf-αおよびIl-1β発現は、CNTs投与により軽度上昇する傾向があり、MWCNT-NとSWCNTで有意差を認めた（図7）。13週においても4週とほぼ同様の結果を認めた。現時点までに、4週の肺RNAサンプルを用いたRNAシーケンシングが終了し、今年度中に解析結果が得られる予定である。

(2) In vivo 実験：NGSによるCNT誘発中皮腫の全ゲノム解析

これまでにCNTによる肺あるいは中皮発癌における体細胞変異や、化学発癌の変異との差異は明らかになっておらず、本研究において新たに検索する点である。R2年度に検索に用いたMWCNTs誘発肺癌組織からは良質のゲノムDNAが得られず、NGS解析が不能であった。ホルマリン固定時間の長さがゲノムDNAの質に影響す

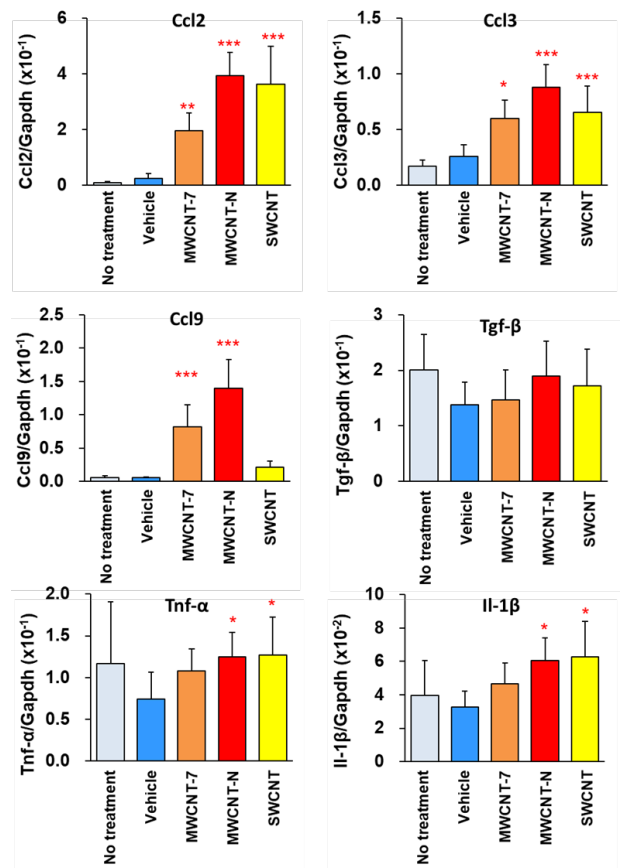


図7. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週（定量RT-PCR）、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle。

ると推測されたため、今年度は固定時間がより短い既存組織を用いて、再度ゲノムDNAの抽出を試みた。雄F344ラットにMWCNT-7をTIPS投与し誘発した心膜中皮腫組織FFPEサンプル2検体から腫瘍と非腫瘍部分を分離して削り取り回収した。ゲノムDNAは、truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用いて抽出した。ゲノムDNAのクオリティを確認したところ、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8）、サンプルの平均長も566-988bpと断片長を保っていた（図9）。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シングを行ったところ、問題なく解析が行われていることを確認できた。

この結果を受け、さらにサンプル3例（非腫瘍部：3検体、腫瘍部：11検体）を追加し、ゲノムDNA抽出を同様の方法で行った。今年度中にNGS解析を行う予定である。

■ 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8. MWCNT-7誘発ラット心膜中皮腫FFPEサンプル由来ゲノムDNAの客観的評価値。

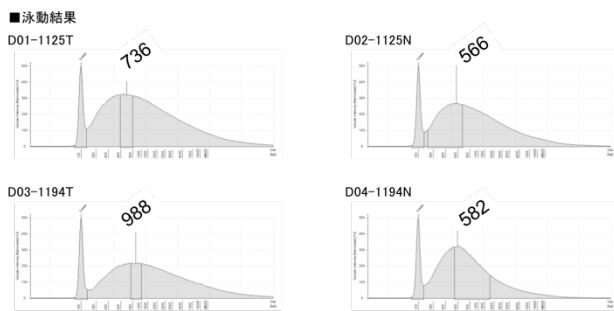


図9. MWCNT-7誘発ラット心臓中皮腫FFPEサンプル由来ゲノムDNAの断片長。

(3) *In vitro*実験: Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

マウスMφ細胞 (RAW264. 7) にCNTsを投与し、細胞生存率と活性酸素種 (ROS) の産生量を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下し、MWCNT-7とMWCNT-Nではその程度が顕著であった (図10)。Mφ細胞中のROS産生は、MWCNT-7およびMWCNT-Nにより有意に増加し、特にMWCNT-7で高値を示した (図11)。一方で、SWCNTでは投与による変化は全く見られなかった。 *In vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めたCcl2のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。 *In vitro*においても、CNTs投与によりいずれも有意な発現上昇を認め、 *in vivo*と類似したパターンを示した (図12)。

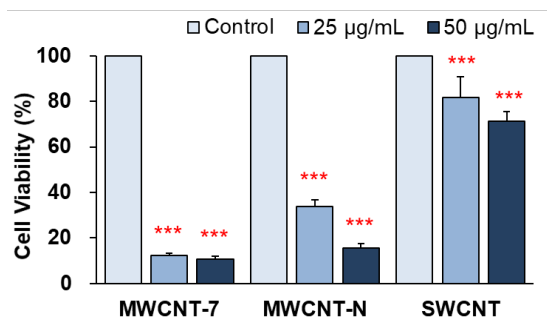


図10. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264. 7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control。

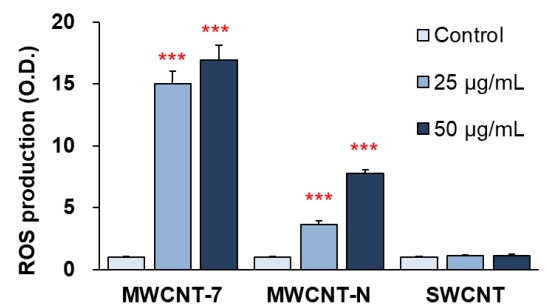


図11. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264. 7) のROS産生量の変化 (DCF-DAアッセイ)、***P < 0.001 vs Control。

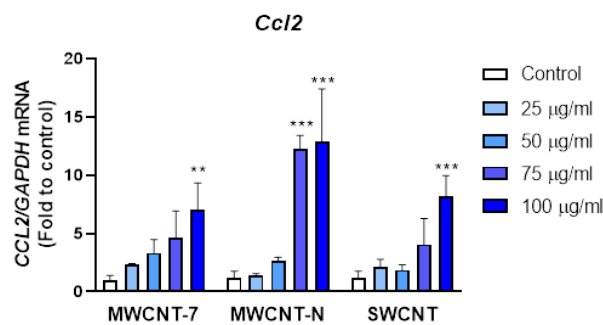


図12. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264. 7) のCcl2発現の変化 (DCF-DAアッセイ)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control。

次に、肺オルガノイドの培養条件を検討するために、以下の条件で培養を行った。①従来法: コーティングしたマトリゲル上にオルガノイドを播種し、さらにマトリゲルを重層化して培養する、②3次元回転培養法: 3次元回転培養装置を用いて、5%マトリゲル含有培養液中で培養する、③超低接着培養法: 超低結合の表面処理をされたフラスコあるいはプレートにより、5%マトリゲル含有培養液中で培養する。その結果、①従来法と比較して、②③はオルガノイドの生育状態が良好で、培養方法はより簡便であった。また①と比較して②③は高価なマトリゲル使用量が少なく、安価に暴露試験が実施できることがわかった。今年度は③の手法で、CNTを暴露しROS産生の程度が明らかになったMφ培養上清を、オルガノイドに投与した。すでにオルガノイドRNAは抽出済みで、現在定量RT-PCRによりmRNA発現解析を進めている。

D. 考察

R2年度は、CNTと同様に炭素原子から構成され、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を陽性対照に設定し、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、肺発がん性を示さないことが明らかになった。急性試験 (1週) では、MWCNT-7、MWCNT-NとFLWにおいて、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺胞Mφの増加を認めた一方、肺におけるROS蓄積やCcl2、Ccl3mRNA発現上昇は、MWCNT-7、MWCNT-Nでのみ認めた。また104週において、肺胞上皮の酸化的DNA損傷レベルはMWCNT-7、MWCNT-Nで高値を示し、FLやFLW投与群における変化は見られなかった。このことから、酸化ストレスの誘導やそれに伴うゲノム障害は、CNTによるAOPとして重要で、発がん性を含めた有害性に関連することが示唆された。

今年度はさらに、発がん性が未知のSWCNTと、陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nを同条件でTIPS投与することにより、層数、鉄含有量、形状などのCNTの物性の差異と肺、中皮に対する有害性の関連を明らかにすることとした。またCNTの有害性について、安定した解析手法により経時的に解析することより、CNTの有害性を正確に描出することが可能となる。それらにより、

CNTのAOPや発がん性に特異的で、有害性の評価指標として有用な遺伝子変化および遺伝子変異を抽出することを試みた。現在、亜急性期（4週）と亜慢性期（13週）までのサンプルを得ており、R2年度の解析結果と類似して、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7投与による、肺胞上皮および中皮におけるDNA損傷の増加と、それと関連した細胞増殖活性の亢進が検出された。いずれの期間においても、肺と中皮に増殖性病変は形成されておらず、DNA損傷マーカー（ γ H2AX）と増殖活性マーカー（Ki67）は、腫瘍発生前の短期試験によるCNTの有害性指標として有用であると考えられる。

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およびMWCNT-N投与による8-OHdGの蓄積は、肺気管支上皮と肺胞上皮とともに、多くの肺胞M ϕ に認められた。これらの所見から、肺胞上皮細胞における酸化ストレスの産生とDNA損傷は、肺胞M ϕ 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。SWCNT投与群では肺胞上皮や気管支上皮に有意な8-OHdG陽性細胞の数を認められなかったことから、SWCNTは上皮において強い酸化DNA損傷を誘発しないと考えられた。

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。NGS解析によりCNTに固有の体細胞変異パターンである変異シグネチャーは、CNTのAOPとして期待され、本研究における新規同定を目指している。R2年度は、MWCNT-7あるいはMWCNT-N誘発肺腺癌FFPEサンプルを用い、ゲノムDNAの抽出を行ったが、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。これはホルマリンの過固定による影響であったと考えられ、今年度は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、追加サンプルのゲノムDNAの抽出を終了し、今年度中にNGS解析を行う予定である。

MWCNTを暴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、アスベスト暴露の症例を含む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、これら新規マテリアル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。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は、*in vitro*においても毒性指標となりうることから、今年度の解析から有望な、酸化DNA損傷マーカー（8-OHdG）DNA損傷マーカー（ γ H2AX）や増殖活性マーカー（Ki67）とともに、引き続き遺伝子発現変化や遺伝子変異について追及していく。M ϕ に対するCNT投与*in vitro*解析では、酸化ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo*試験と同様に変動する指標が得られており、生体の肺胞M ϕ と類似した環境を現わしているものと考えられる。本年度は、肺オルガノイド培養条件を検討し、マトリゲル重層下で培養する従来法と比較して、マトリゲル含有培地内で培養する手法の方が、CNT投与、共培養やオルガノイドからのRNA、タンパク抽出に適していることが示唆された。肺オルガノイド培養系においても、酸化ストレス、サイトカイン発現やNGSによるゲノム変化を解析し、さらに*in vivo*と連動する指標を蓄積させる。

E. 結論

R2年度に行った104週TIPS試験では、FLおよびFLWは肺発がん性がないことが明らかとなり、MWCNT-7とMWCNT-Nの肺発がん性には、肺胞上皮核における8-OHdG発現レベルの上昇が関与していた。また今年度は、同様にMWCNT-7、MWCNT-Nと肺発がん性が未知のSWCNTをTIPS投与し、亜急性（4週）および亜慢性毒性（13週）まで解析した。その結果、MWCNT-7及びMWCNT-N投与群では、104週と同様に、肺胞上皮の核DNA 8-OHdG形成レベルの上昇が認められ、サイトカイン発現量や、増殖活性も関連して増加した。以上より、CNTの発がん機序に酸化DNA損傷による細胞増殖の活性化が関与していると考えられる。一方でSWCNT投与群ではそれらの変化はないか非常に少なかったことから、SWCNTによる有害性はないか少ないことが予測され、今後の解析が待たれる。*In vitro*試験では、*in vivo*試験で有用であった指標について、CNT暴露による毒性変化を解析している。M ϕ では、酸化ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo*試験と同様にCNTにより変動する指標が得られており、引き続き肺オルガノイドを用いて同様の解析をする。

R2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、NGS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の抽出を終了し、今年度中にNGS解析を行う予定としている。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

1. Aoyama Y, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 14: 42, 2022.
2. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Nagai T, Etani T, Nozaki S, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Tomiyama N, Banno R, Kubota H, Hamamoto S, Ando R, Kawai N, Yasui T. Chronological transition in outcome of second-line treatment in patients with metastatic urothelial cancer after pembrolizumab approval: a multicenter retrospective analysis. *Int J Clin Oncol*. 27:165-174, 2021.
3. Nakagawa M, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Ozawa Y, Shimohira M, Ohnishi M, Shibamoto Y. Usefulness of advanced monoenergetic reconstruction technique in dual-energy computed tomography for detecting bladder cancer. *Jpn J Radiol*. 40:177-183, 2021.
4. Kachi K, Kato H, **Naiki-Ito A**, Komura M, Nagano-Matsuo A, Naitoh I, Hayashi K, Kataoka H, Inaguma S, Takahashi S. Anti-Allergic Drug Suppressed Pancreatic Carcinogenesis via Down-Regulation of Cellular Proliferation. *Int J Mol Sci*. 22:7444, 2021.
5. Subhawa S, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kato H, Naiki T, Komura M, Nagano-Matsuo A, Yeewa R, Inaguma S, Chewonarin T, Banjerdpongchai R, Takahashi S. Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 13:3403, 2021.
6. Matsui T, Hamada-Tsutsumi S, Naito Y, Nojima M, Iio E, Tamori A, Kubo S, Ide T, Kondo Y, Eguchi Y, Komori A, Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, Shirabe K, Kimura K, Hiasa Y, Chuaypen N, Tangkijvanich P, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Ochiya T, Tanaka Y. Identification of microRNA-96-5p as a postoperative, prognostic microRNA predictor in nonviral hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 52:93-104, 2021.
7. Isobe T, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Etani T, Nagai T, Nozaki S, Kobayakawa Y, Iwatsuki S, Matsuyama N, Kato H, Kawai N, Yasui T. Rare case of immunoglobulin G4-related disease arising in gonadal glands with long-term remission without steroid treatment: Discussion and literature review. *IJU Case Rep*. 4:188-191, 2021.
8. **Naiki-Ito A**. [The roles of gap junctional intercellular communication in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and liver fibrosis]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 156:152-156, 2021.
9. Tasaki Y, Suzuki M, Katsushima K, Shinjo K, Iijima K, Murofushi Y, **Naiki-Ito A**, Hayashi K, Qiu C, Takahashi A, Tanaka Y, Kawaguchi T, Sugawara M, Kataoka T, Naito M, Miyata K, Kataoka K, Noda T, Gao W, Kataoka H, Takahashi S, Kimura K, Kondo Y. Cancer-Specific Targeting of Taurine-Upregulated Gene 1 Enhances the Effects of Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 81:1654-1666, 2021.
10. Kato H, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 42:940-950, 2021.
11. Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, **Naiki-Ito A**, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch*. 479:277-284, 2021.
12. 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.
13. 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*. 36: 628-634, 2022.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. **Totsuka Y**, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*. 112, 7-15, 2021.
18. Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One*. 17, e0263895, 2022.
19. **Kakehashi A**, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers*. 13: 3613, 2021.

20. **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(6): 1216, 2021.
21. Tagami M, **Kakehashi A**, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Expe Ophthalmol*. 259: 3127-3136, 2021.
22. Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z, Fan J, Qin L, Alexander DB, **Tsuda H**, Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*. 12: 1-13, 2021.
23. Tanaka H, Gunasekaran S, Saleh D, Alexander TW, Alexander DB, Ohara H, **Tsuda H**. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochem Cell Biol*. 99: 159-165, 2021.
2. 学会発表
1. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝線維化に対する紫米抽出物の抑制効果、第110回日本病理学会 (2021年4月、東京都新宿区/ハイブリッド開催)
 2. 加藤寛之、**内木綾**. STAT3-DPYD 経路を介した Luteolin の膵癌化学予防効果の検討. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会 (2021 年 6 月、Web 開催)
 3. **Aya Naiki-Ito**, Ranchana Yeewa, Hiroyuki Kato, Teera Chewonarin, Satoru Takahashi. Chemopreventive effect of purple rice extract on rat non-alcoholic steatohepatitis and hepatocarcinogenesis, 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. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、高橋智. ラット非アルコール性脂肪肝炎に対する紫米抽出物の化学予防効果、第38回日本毒性病理学会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
 5. Sheema Asraful Nahar, **Aya Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, Masayuki Komura, Hiroyuki Tsuda, Satoru Takahashi. Evaluation of lung and mesothelial carcinogenicity of single-walled carbon nanotube compared with MWCNT-7 and MWCNT-N, 第38回日本毒性病理学会 (2022年1月、神戸/ハイブリッド開催)
 6. **内木綾**. 非アルコール性脂肪肝炎・肝線維症に対する細胞間コミュニケーションの役割と予防剤の探索. 第99回日本生理学会大会シンポジウム (2022年3月、仙台/ハイブリッド開催)
 7. **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)
 8. **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)
 9. **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)
 10. **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)
 11. **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)
 12. **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)
 13. **梯アテナ**、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirifica のエストロゲン作用による Donryu ラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会 (2021 年 6 月、東京/ハイブリッド開催)
 14. 藤岡正喜、**梯アテナ**、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性が Donryu ラットにおける乳がん及び子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会 (2021 年 6 月、東京/ハイブリッド開催)
 15. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アテナ**、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021 年 7 月、神戸/ハイブリッド開催)
 16. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、**梯アテナ**、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 DPAA のマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響およびその機序の検討. 2021 年度新学術領域研究「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(AdAMS)】」若手支援技術講習会 (2021 年 9 月、オンライン開催)
 17. **梯アテナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子として CNPY2 の役割. 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)
 18. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アテナ**、鰐淵英機. 職業性ばく露芳香族アミンによる膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝の関係. 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)
 19. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、**梯アテナ**、鰐淵英機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん超短期検出法. 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)

20. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、**梯アンナ**、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 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)
21. **梯アンナ**、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
22. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響および尿中代謝物との関係. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
23. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 1,4- ジオキサンの in vivo 変異原性および発がん性の定量解析. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
24. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、**梯アンナ**、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 DPAA のマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響およびその機序の検討. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
25. 西土井悠作、鈴木周五、魏民、**梯アンナ**、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
26. 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、**梯アンナ**、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤 Acetazolamide の Wnt/ β カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
27. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, **Hiroyuki Tsuda**. Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS-7) in rat model, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021 年 7 月、神戸/ハイブリッド開催)
28. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, **Hiroyuki Tsuda**. Short term pulmonary toxicity study of carbon nano-horns (CNH) and carbon nano-brushes (CNB) using intra tracheal method, 第 38 回日本毒性病理学会、(2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
29. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, **Hiroyuki Tsuda**. Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation, Society of Toxicology, (2022年3月, San Diego)

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。