

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（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。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。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の抽出を行ない、NGSによる全ゲノム解析(WGS)を実施した。現在、までに6検体のWGS解析とそのデータを用いた変異シグネチャーの解析が終了している。その結果、検出されたSNVの数は1,000~16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー(Rat_SBS_A, Rat_SBS_B)が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数(15,000~16,000)が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。現在、MWCNT及び化学物質暴露による中皮腫及び肺がんの追加解析を行いつつ、Indel解析や変異のストランドバイアスなどの解析を行っている。本研究によ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。

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

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)

該当なし

C. 研究結果

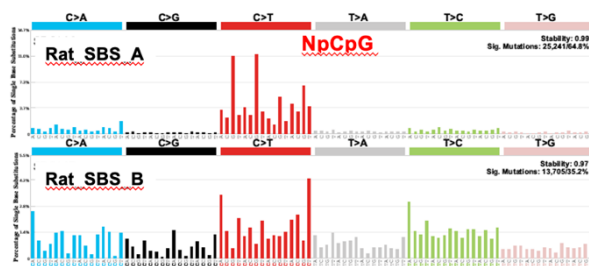
ラットにMWCNTをTIPS投与し誘発した中皮腫のFFPEサンプル6検体から腫瘍/非腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用いて抽出した。これらのサンプルよりライブラリを調製し、イルミナ社のNovaSeq6000による全ゲノムシーケンシング (150bp Paired End)を行った。得られたゲノムデータを既存のラットゲノム配列 (rn6) にマップし、変異Caller (MuTect2およびStrelka)により体細胞変異の検出を行った。検出されたSNVs (1塩基変異) について表1に示す。

表1 各サンプルに検出された変異数

Tumor	#SNVs
D01-1125T	16162
D03-1194T	15379
D01-1121_T	2971
D02-1122_T	1146
D03-1118_1_T	2287
D04-1118_2_T	1001

次にこれら変異データを元にNMF解析により変異シグネチャーの抽出を行った。その結果、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー (Rat_SBS_A, Rat_SBS_B) が同定された (図1)。

図1 MWCNT暴露により誘発した中皮腫サンプルから同定された変異シグネチャー



これら変異シグネチャーと既存の変異シグネチャー

(<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>) との類似度について検討した結果を表2に示す。

表2 ラット中皮腫より同定された変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似性

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat SBS_A	MWCNT	SBS1	0.81
		SBS6	0.80
		SBS87	0.81
Rat SBS_B	MWCNT	SBS3	0.83
		SBS5	0.91
		SBS40	0.90
		SBS92	0.81

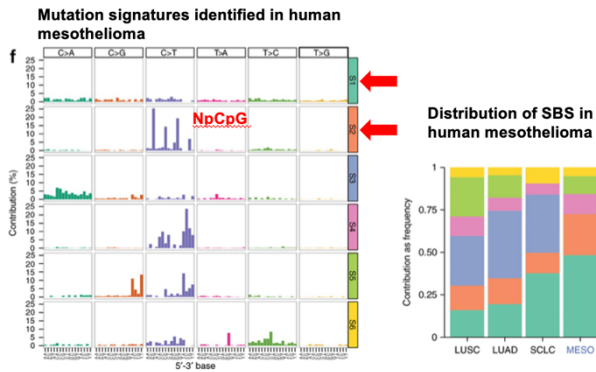
図2 各変異シグネチャーの要因

- SBS1; Clock-like**
- SBS6; Defective DNA MMR**
- SBS87; Thiopurine chemotherapy**
- SBS3; Defective HR-DDR**
- SBS5; Unknown (clock-like)**
- SBS40; Unknown**
- SBS92; Tobacco smoking**

一般的にCosine similarityは0.85以上で類似していると考えられていることから、Rat_SBS_Bは、Clock-like、Unknownのシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_Aは、Clock-like、Thiopurine chemotherapyのシグネチャーと比較的類似しているが、新規の変異シグネチャーである可能性も示唆された。

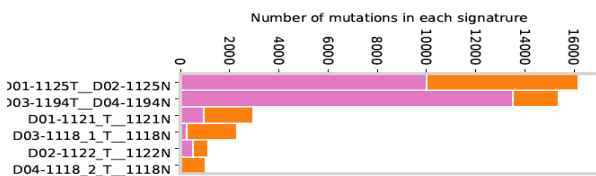
また、Rat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた (Bueno et al, nat. genet. (2016)、図3)。

図3 ヒト中皮腫を含む肺がんで観察された変異シグネチャー



さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_2の寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった（図4）。

図4 ラット中皮腫サンプル内の各変異シグネチャーの分布



現在、MWCNT及び化学物質暴露による中皮腫及び肺がんの追加解析を行いつつ、Indel解析や変異のストランドバイアスなどの解析を行っている。

D. 考察

MWCNT暴露のラット中皮腫6サンプル（FFPE）からゲノムDNAを抽出し、NGS解析によるWGS解析を行った。その結果、検出されたSNVの数は1,000～16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。この、サンプルによるSNV数および変異シグネチャー分布の違いと病理組織像との間に何か関係がないかと調べてみたが、今回のラットサンプルはいずれも肉腫型で、1121の一部のみに上皮型配列が観察された。一方、1194と1125は肉腫型のな

かでも分裂像が多く細胞の多形性が強い（いわゆる悪性度高そうな）傾向がありそうだが、他のサンプルとの明らかな違いはなさそうとのことであった。現在、MWCNT暴露を含む化学物質暴露による、中皮腫および肺がんの追加解析を実施している。これらの追加データにより、サンプルによるSNV数および変異シグネチャー分布の違いの要因についてより詳細な検討が可能となると思われる。

また、今回、非常に多くのSNV数が観察された2検体では、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から抽出された変異シグネチャーと類似するRat_SBS_Aの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT暴露により誘発した中皮腫とヒト中皮腫の発生メカニズムは類似していることが示唆された。現在のところ、これらシグネチャーは中皮腫に特徴的なものなのか、あるいは、アスベストやMWCNTのような繊維状の物質の暴露に特徴的なものが不明であるが、さらに検体を追加して解析することで、この点も明らかになると考えている。現在、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行っている。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

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、NGSによる全ゲノム解析（WGS）を実施した。現在、までに6検体のWGS解析とそのデータを用いた変異シグネチャーの解析が終了している。その結果、検出されたSNVの数は1,000～16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。さらに、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行うことで、発がんメカニズム解明やリスク評価

などに有用な情報が得られると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* 35:1625-1630, 2022.
2. 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.
3. 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.* 12: 768781, 2021.
4. 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
5. 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.
6. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 112, 7-15, 2021.
7. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putharoen 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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

1. 戸塚ゆかり、小宮雅美、永井桃子、加藤 護。次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
2. 広田航太郎、山口大雅、小宮雅美、稲葉洋平、加藤孝一、戸塚ゆかり。加熱式タバコの遺伝毒性評価、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
3. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆかり。マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
4. Yukari Totsuka. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development, 12th AACR-JCA Joint Conference（2022年12月、ハワイ・米国）

5. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤 護、松田知成. 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 35 回発癌病理研究会 (2022 年 11 月、新潟)
6. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析、第 51 回環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
7. 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜. DNA 鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価、第 51 回環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
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 1 回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022 年 11 月、東京)
9. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 第 81 回日本癌学会学術総会シンポジウム (2022 年 9 月、横浜)
10. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues, 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
11. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer, 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
12. Yukari Totsuka. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer, 13th ICEM (2022 年 8 月、オタワ・カナダ)
13. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines, 13th ICEM (2022 年 8 月、オタワ、カナダ)
14. 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析、第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月、京都)
15. 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-Anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する、第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月、京都)
16. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望、第 49 回日本毒性学会 (2022 年 6 月、札幌)
17. 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)
18. 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)
19. 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)
20. 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)
21. 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)
22. 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)
23. 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)
24. 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)
25. 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)

26. 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)
27. 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)
28. 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)
29. 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)

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。