

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

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。今年度は MWCNT または DHPN 曝露のラット中皮腫/肺腫瘍 15 サンプルからゲノム 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 DHPN では 60,000～160,000 程度であり、MWCNT-7 では 250～16,000 程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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）といずれの変異パターンもまんべんなく検出される Rat_SBS_C が同定された。全ての DHPN サンプルにおいて Rat_SBS_A が 90%以上を占めていることから、Rat_SBS_A が DHPN に由来するシグネチャーであると同定した。一方、MWCNT-7 では、Rat_SBS_B 及び Rat_SBS_C がメジャーなシグネチャーであり、これら 2 種の変異シグネチャーが MWCNT-7 に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B 及び C は自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7 の発がんメカニズムとしては、MWCNT-7 曝露による宿主側の 2 次的な反応などを介していることが示唆された。また、MWCNT-7 曝露において、比較的多くの SNV 数が観察された検体では、アスベスト曝露の症例を含む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変異シグネチャー（Rat_SBS_B）の寄与率が非常に高かったことから、MWCNT 曝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。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。

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-7 を SD 及び F344 ラットに経気管肺内噴霧（TIPS）投与を実施し、発生した肺がん及び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。同時に、肺がんの陽性対照としてニトロソ化合物である DHPN（N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine）を F344 ラットに皮下投与して作成した肺腫瘍についても解析を行なった。SD ラットに MWCNT-7 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。一方、F344 ラットに MWCNT-7 または DHPN を投与して得られた胸膜中皮腫及び中皮腫は凍結サンプルより DNA を抽出し、SD ラットサンプルと同様に全ゲノム解析を実施した。得られたデータから、Mutect（Ver2）、Strelka（Ver2）を用いて変異検出を行い、

SigProfilerExtractor (v. 1.1.3)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行なった。

(倫理面の配慮)

該当なし

C. 研究結果

ラットに MWCNT 及び DHPN を投与し誘発した中皮腫/肺がん 15 検体 (MWCNT : 9 検体、DHPN:6 検体) から抽出した DNA 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ス (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。その結果を表 1 に示す。表 1 からわかるように、DHPN による肺がんでは MWCNT-7 による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察されていることがわかった。

表 1 ラット肺がん及び中皮腫に検出された変異数

Chemicals	Tumor	Total Numbers of SNVs
DHPN	Lung	82176
DHPN	Lung	74235
DHPN	Lung	65035
DHPN	Lung	90249
DHPN	Lung	108435
DHPN	Lung	161228
MWCNT-7	Lung	431
MWCNT-7	Mesothelioma	462
MWCNT-7	Mesothelioma	255
MWCNT-7	Mesothelioma	2971
MWCNT-7	Mesothelioma	16162
MWCNT-7	Mesothelioma	1146
MWCNT-7	Mesothelioma	2287
MWCNT-7	Mesothelioma	15379
MWCNT-7	Mesothelioma	1001

さらに、SigProfilerExtractorで解析した結果3種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~C) が同定された (図 1)。このうち、Rat_SBS_A 及びBはC:G to T:A変異が顕著な特徴を持つ変異シグネチャーであった。

また、各サンプルにおける変異数と3種類の変異シグネチャー分布について図 2- 1 に示す。図 2- 1 からわかるように、DHPNによる肺がんではMWCNT-7による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察され、同定された変異シグネチャーの分布も、全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A (黄緑色) が90%以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-7ではサンプル毎のばらつきが大きく、比較的多い変異数が観察されたサンプルでも16,000程度であり、化学発がん物質であるDHPNと比較しても圧倒的に少ない変異数であることがわかった。また、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_B (黄土色) が観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いでRat_SBS_C (紫色) の占める割合が多いことがわかった (図 2- 2)。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察されていた。

図 1 MWCNT/DHPN曝露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された変異シグネチャー

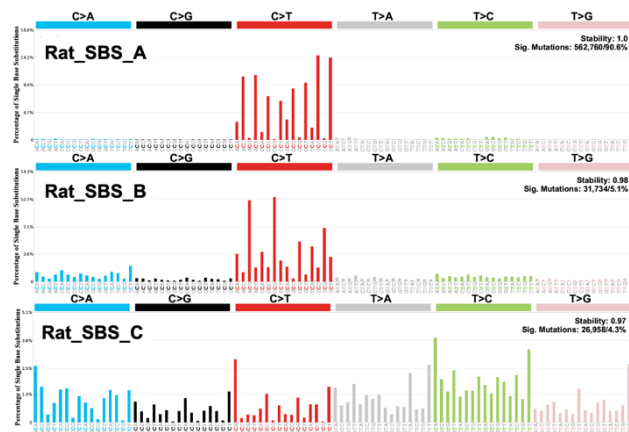


図 2- 1 サンプル毎の変異数と3種類の変異シグネチャー分布

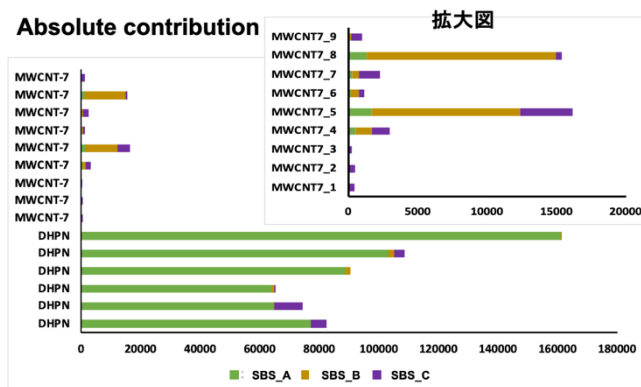
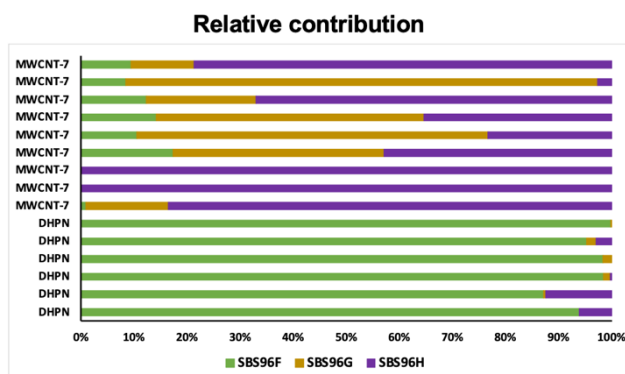


図 2- 2 サンプル毎の3種類の変異シグネチャー分布割合



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及びその要因

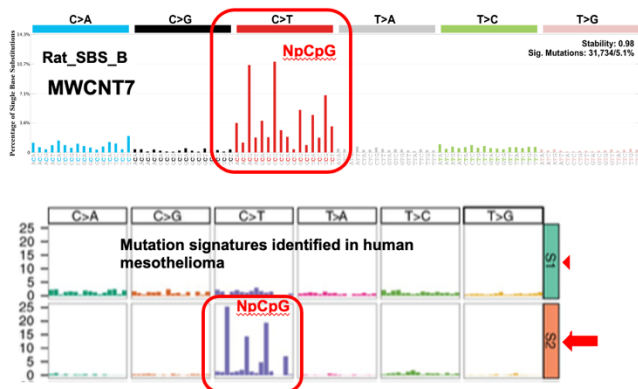
Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity	Etiology
RatSBS_A	DHPN	SBS11	0.97	Alkylating agents
RatSBS_B	MWCNT7	SBS1	0.81	Spontaneous or enzymatic deamination of 5-methylcytosine Thiopurine chemotherapy treatment
		SBS87	0.82	
RatSBS_C	MWCNT7	SBS5	0.81	Clock-like

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_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_B及びCは、Thiopurine chemotherapy, 5-メチルシトシンの脱アミノ化などによる自然発生突然変異など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_B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することもわかった (Bueno et al, nat. genet. (2016)、図3)。

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_Bの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Cの寄与率が高いことがわかった(図2-2)。

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



現在、MWCNT及び化学物質曝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またはDHPN曝露のラット中皮腫/肺腫瘍15サンプルからゲノム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DHPNでは60,000~160,000程度であり、MWCNT-7では250~16,000程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出されるRat_SBS_Cが同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A(黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。既存の変異シグネチャーとの類似解析の結果、Rat_SBS_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していた。DHPNはニトロソ化合物であるが、既存のアルキル化剤と同様にDNAのグアニン塩基にアルキル化付加体を形成し、これが高頻度にG to A(相補鎖だとC to T)の変異を導入していることが考えられる。一方、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_Bが観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いで

Rat_SBS_C(紫色)の占める割合が多いことがわかった。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察されていた。このことから、これら2種の変異シグネチャーがMWCNT-7に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7の発がんメカニズムとしては、DHPNのように直接的にDNAに作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7曝露による宿主側の2次反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNTなどのナノマテリアルによる変異誘発メカニズムとしては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。一方、Rat_SBS_Cの割合が高く観察された検体は凍結サンプルからDNAを抽出したものであることから、組織の不均一性が影響している可能性も示唆された。また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、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から抽出された変異シグネチャーと類似するRat_SBS_Bの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT曝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曝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

MWCNTまたはDHPN曝露のラット中皮腫/肺腫瘍15サンプルからゲノム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DHPNでは60,000~160,000程度であり、MWCNT-7では250~16,000程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出されるRat_SBS_Cが同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A(黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。既存の変異シグネチャーとの類似解析の結果、Rat_SBS_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していた。DHPNはニトロソ化合物であるが、既存のアルキル化剤と同様にDNAのグアニン塩基にアルキル化付加体を形成し、これが高頻度にG to A(相補鎖だとC to T)の変異を導入していることが考えられる。一方、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_Bが観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いでRat_SBS_C(紫色)の占める割合が多いことがわかった。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察さ

れていた。このことから、これら2種の変異シグネチャーが MWCNT-7 に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B 及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7 の発がんメカニズムとしては、DHPN のように直接的に DNA に作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7 曝露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNT などのナノマテリアルによる変異誘発メカニズムとしては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。また、今回、比較的多くの SNV 数が観察された検体では、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から抽出された変異シグネチャーと類似する Rat_SBS_B の寄与率が非常に高かったことから、MWCNT 曝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。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. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2024.

2. 学会発表

1. **戸塚ゆかり**. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価法 日本薬学会144年会 (2024年3月、横浜)
2. **戸塚ゆかり**. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析、日本酸化ストレス学会 (2023年12月、川崎)
3. **Totsuka Y**. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
4. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式タバコの遺伝

毒性評価、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)

5. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、**戸塚ゆかり**. アドバンストナノマテリアルのin vitro遺伝毒性評価、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
6. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
7. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、**戸塚ゆかり**. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
8. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、**戸塚ゆかり**. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
9. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
10. **Totsuka Y**. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023年9月、シカゴ・米国)
11. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式タバコの遺伝毒性評価、がん予防学術大会2023 (2023年9月、金沢)

G. 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。