

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 星薬科大学薬学部 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SWCNT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、観察されたSBS、DBS、ID変異数はSWCNTの方がMWCNT-N/Bよりも多かった。NMF解析により、C:G to T:A/A:T変異に特徴があるSBS_AシグネチャーとT:A to G:C変異に特徴があるSBS_Bシグネチャーが抽出された。各サンプルにおけるSBS_A/Bの分布の割合から、SBS_AはSWCNT由来、SBS_BはMWCNT-N/B由来であると推測できた。類似解析の結果から、Rat_SBS_Bは新規のシグネチャーであり、Rat_SBS_AはSBS3、SBS5、SBS40と類似していることがわかった。SWCNT曝露群ではDBSが観察されたが、MWCNT-N/B曝露群では殆ど観察されなかった。また、ID解析の結果では、1塩基の欠失/挿入変異が優位である3種のIDシグネチャーが抽出され、このうち、T/Aの連続6base以上の箇所では1塩基欠失/挿入変異が優位であるID_AシグネチャーはSWCNT由来、T/Aの連続6base以上の箇所では1塩基欠失変異が優位であるID_BはMWCNT-M/B由来であることが推測された。このうち、ID_BはCOSMICデータのID2と類似していた。一方、MWCNT-7はすべての解析結果において、SWCNTと同様の傾向を示した。現在、Mutect2でもゲノム変異解析を実施しており、これらのデータを統合することで、信憑性の高い結果が得られると考えている。また、MWCNT-7曝露やその他の肺発がん物質の解析結果とも統合して変異シグネチャーの解析を実施し、発がんメカニズムの解明や人発がんにおける貢献度などについても検討する。

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

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。

(倫理面の配慮)

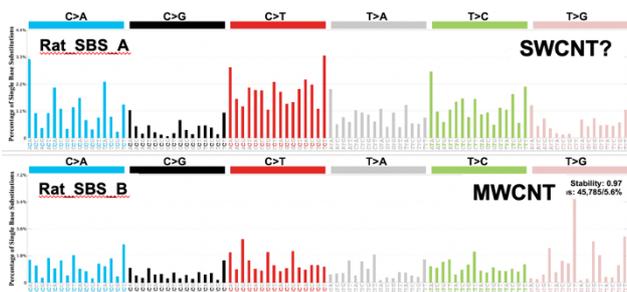
該当なし

C. 研究結果

ラットにSWCNT, MWCNT-N/Bを投与し誘発した中皮腫/肺がん15検体 (SWCNT: 7検体, MWCNT-N: 4検体, MWCNT-B: 3検体, MWCNTY-7: 1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 (Strelka) により体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換 (SBS) 解析を実施した結果、2種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_AおよびB) が同定された (図1)。

このうち、Rat_SBS_AはC:G to T:A/A:T変異に特徴があり、Rat_SBS_BはT:A to G:C変異に特徴がある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2種類の変異シグネチャー分布について図2に示す。図2からわかるように、SWCNTおよびMWCNT-7による中皮腫では、MWCNT-NおよびB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、全てのサンプルにおいてRat_SBS_A (ピンク色) が90%以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-NおよびBではSWCNTやMWCNT-7と比較しても圧倒的に少ない変異数であり、かつ全ての検体でRat_SBS_B (オレンジ色) の占める割合が多いことがわかった (図2)。

図1 SWCNT/MWCNT-NおよびB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SBS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1に示す。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、SBS5およびSBS40 (いずれも要因は不明) 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は、新規の変異シグネチャーである可能性が示唆された。

図2 サンプル毎のSBS変異数と2種類の変異シグネチャー分布

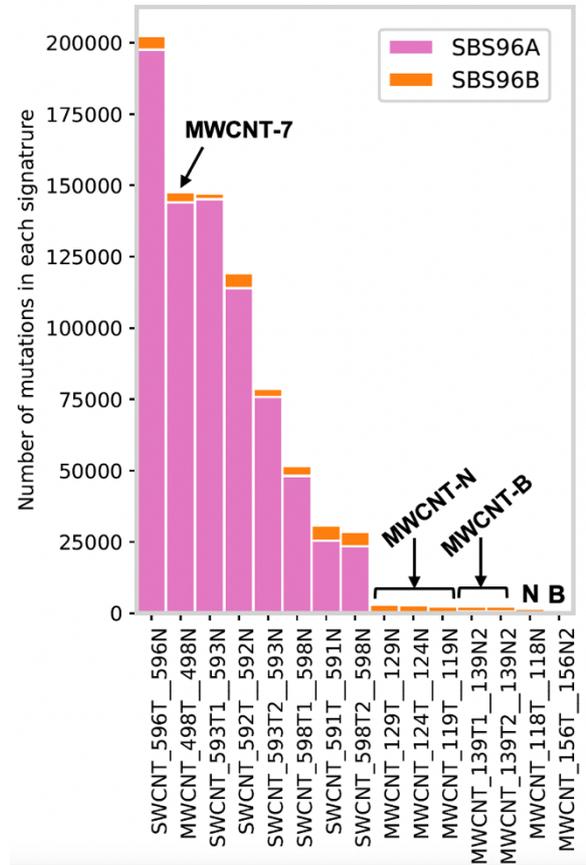


表1 ラット中皮腫より同定された変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似性

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat SBS_A	SWCNT	SBS3	0.80
		SBS5	0.86
		SBS40	0.87
Rat SBS_B	MWCNT	SBS3	0.72
		SBS5	0.71
		SBS9	0.73
		SBS40	0.77

次に、2塩基置換 (DBS) および欠失変異 (ID) についても同様に解析を実施した。その結果、SWCNT曝露群ではDBSが観察されたが、MWCNT-N/B曝露群では殆ど観察されなかった (図3-1)。また、2種類のDBSシグネチャーが抽出されたが、いずれも既存のDBSシグネチャーとは類似せず、新規のシグネチャーであることがわかった (図3-2)。

複製の際の Slippage により導入される挿入欠失変異)と類似していた (図4- 1、 2)。

図3- 1 サンプル毎の DBS 変異数と 2 種類の変異シグネチャー分布

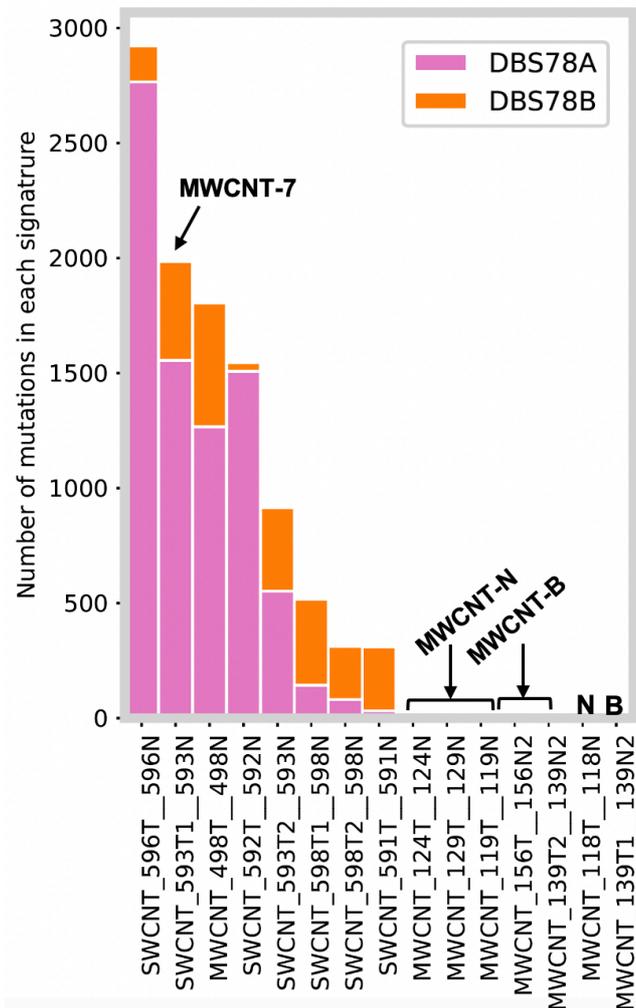


図3- 2 SWCNT/MWCNT-NおよびB曝露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定されたDBS変異シグネチャー



一方、挿入欠失変異 (ID) 解析の結果、1 塩基の欠失/挿入変異が優位である 3 種の ID シグネチャーが抽出され、このうち、T/A の連続 6 base 以上の箇所では 1 塩基欠失/挿入変異が優位である ID_A シグネチャーは SWCNT 由来、T/A の連続 6 base 以上の箇所では 1 塩基欠失変異が優位である ID_B は MWCNT-M/B 由来であることが推測された。このうち、ID_B は COSMIC データの ID2 (DNA

図4- 1 SWCNT/MWCNT-N および B 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 ID 変異シグネチャー

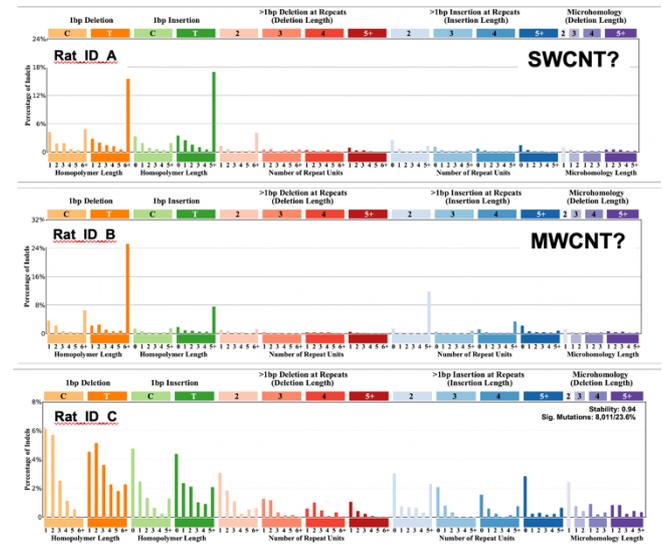


図4- 2 サンプル毎の ID 変異数と 3 種類の変異シグネチャー分布

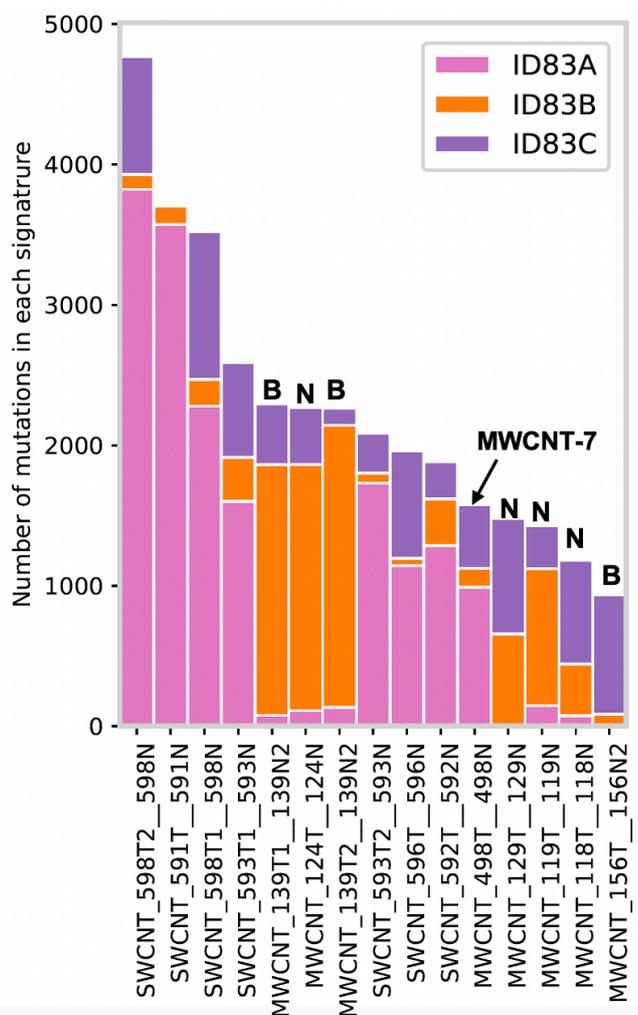


表2 ラット中皮腫より同定された変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似性

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat ID_A	SWCNT	ID1	0.66
Rat ID_B	MWCNT	ID2	0.83
Rat ID_C	MWCNT	ID5	0.69

D. 考察

SWCNTおよびMWCNT-Nまたは-B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SWCNT曝露群で非常に多く、MWCNT-Nまたは-B曝露では少ないことがわかった。また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNT/MWCNT-7とMWCNT-N/-Bでは大きく異なっており、これらナノマテリアル曝露における発がんのメカニズムが異なることが示唆された。なお、本結果はStrelka (Ver2)を用いて変異検出を行い、SigProfilerExtractor (v. 1.1.3)にて解析したものであり、現在、Mutect 2でもゲノム変異解析を実施しており、これらのデータを統合することで、信憑性の高い結果が得られると考えている。

また、昨年度までに解析したMWCNT-7曝露やその他の肺発がん物質の解析結果とも統合して変異シグネチャーの解析を実施し、発がんメカニズムの解明や人発がんにおける貢献度などについても検討する予定である。

E. 結論

MWCNT または SWCNT 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、観察された SBS, DBS, ID 変異数は SWCNT の方が MWCNT-N/B よりも多かった。NMF 解析により、C:G to T:A/A:T 変異に特徴がある SBS_A シグネチャーと T:A to G:C 変異に特徴がある SBS_B シグネチャーが抽出された。各サンプルにおける SBS_A/B の分布の割合から、SBS_A は SWCNT 由来、SBS_B は MWCNT-N/B 由来であると推測できた。類似解析の結果から、Rat_SBS_B は新規のシグネチャーであり、Rat_SBS_A は SBS3, SBS5, SBS40 と類似していることがわかった。SWCNT 曝露群では DBS が観察されたが、MWCNT-N/B 曝露群では殆ど観察されなかった。また、ID 解析の結果では、1 塩基の欠失/挿入変異が優位である 3 種の ID シグネチャーが抽出され、このうち、T/A の連続 6 base 以上の箇所では 1 塩基欠失/挿入変異が優位である ID_A シグネチャーは SWCNT 由来、T/A の連続 6 base 以上の箇所では 1 塩基欠失変異が優位である ID_B は MWCNT-M/B 由来であることが推測された。このうち、ID_B は COSMIC データの ID2 と類似していた。一方、MWCNT-7 はすべての解析結果において、SWCNT と同様の傾向を示した。現在、Mutect 2 でもゲノム変異解析を実施しており、これらのデータを統合することで、信憑性の高い結果が得られると考えている。また、MWCNT-7 曝露やその他の肺発がん物質の解析結果とも統合して変異シグネチャーの解析を実施し、発がんメカニズムの解明や人発がんにおける貢献度などについても検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y**. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int J Mol Sci*. 25, 2024.
- Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y**. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Oct;899:503821. 2024.
- Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y**. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci*. 49(10):425-434, 2024.

2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里**、マウス正常組織由来オルガノイドを

- 用いた化学物質の遺伝毒性評価、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
2. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ヶ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆかり、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規毒性試験法の開発、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
 3. 渡部 浩平、下村 航平、安藤 彩花、佐藤 玲香、鈴木 千咲、武内 まどか、三好 規之、小林琢磨、戸塚 ゆかり、加藤孝一、中嶋順一、二環芳香族アミンにおける遺伝毒性評価、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
 4. 本橋実奈、高村岳樹、佐々彰、加藤孝一、中嶋順一、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、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
 5. 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、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
 6. 戸塚 ゆかり、石ヶ守里加子、牛山明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入暴露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、第53回日本環境変異原ゲノム学会（2024年12月、岡山）
 7. 戸塚 ゆかり、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、第53回日本環境変異原ゲノム学会（2024年12月、岡山）
 8. 石ヶ守里加子、柳澤萌、大野彰子、戸塚 ゆかり、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストナノマテリアルの毒性評価、第53回日本環境変異原ゲノム学会（2024年12月、岡山）
 9. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚 ゆかり、N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、第53回日本環境変異原ゲノム学会（2024年12月、岡山）
 10. 渡部浩平、三好規之、戸塚 ゆかり、二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、第53回日本環境変異原ゲノム学会（2024年12月、岡山）
 11. 戸塚 ゆかり、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第85回MMS秋の定例会（2024年12月、岡山）
 12. 戸塚 ゆかり、DNA付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、第47回日本分子生物学会年会（2024年11月、福岡）
 13. 戸塚 ゆかり、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、環境エピゲノミクス研究会（EEG）2024秋季ネットシンポジウム（2024年11月、Web開催）
 14. 戸塚 ゆかり、DNA付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム（2024年10月、文京区）
 15. 戸塚 ゆかり、小宮雅美、煙山紀子、加藤護、Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products, 第83回日本癌学会学術総会（2024年9月、福岡）
 16. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, (2024年6月、京都)
 17. Yukari Totsuka, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 第42回札幌国際がんシンポジウム（2024年6月、札幌）
 18. 戸塚 ゆかり, DNA付加体研究の過去・現在・未来、令和6年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム（2024年6月、港区）
- 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