

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。今年度はラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体の全ゲノムシーケンスを行ない、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、7種類の変異シグネチャー（Rat_SBS_A～G）を同定した。

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A～CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7と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。

現在、これらゲノム解析データを用いて、2塩基置換（DBS）変異や挿入・欠失（ID）の解析を実施している。また、同様の構造体であるアスベストによるヒト肺がん・中皮腫では、特徴的なSBS変異シグネチャーは見つからず、むしろ大きな（染色体）構造変化が顕著であることが報告されている。MWCNTおよびSWCNTでも同様な現象が観察される可能性が考えられることから、構造異常（CV）についても解析を進める予定である。得られるデータは発がん機序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

SWCNT および MWCNT-N/B を F344 ラットに TIPS 投与し、発生した肺がん及び中皮腫サンプルを用いてこれら化学物質に由来する変異シグネチャーの同定を試みる。

変異シグネチャーの比較として、肺発がん物質であるDHPNおよびNNKによるラット肺がんについてもゲノム解析を実施した。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、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-N/BまたはDHPN, NNKを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺がんは凍結サン

ブルより DNA を抽出し、同様に全ゲノム解析を実施する。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実施した。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

ラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体 (DHPN: 12検体、NNK: 3検体、SWCNT: 7検体、MWCNT-7: 12検体、MWCNT-N: 4検体、MWCNT-B: 3検体、MWCNT-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ス (150bp Paired End) を行った (表1)。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およびMutect 2) 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、7種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~G) が同定された (図1)。

また、各サンプルにおける変異数と7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、強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察された。一方、SWCNTおよびMWCNT-7、-NまたはMWCNT-B暴露のラット中皮腫/肺腫瘍サンプルの結果では、検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~Cは DHPN由来、SBS_Dは SWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測できた。

表1 肺がん・中皮腫サンプルリスト

Chemical	Strain	Histology	Experimental Facilities	Normal
DHPN (N=12)	F344	Ad. Carcinoma (7), Adenoma (1), S. C. Carcinoma (3), Hyperplasia (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
NNK (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-N (N=4)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-B (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=5)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=7)	F344	Mesothelioma (6), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Naiki Lab	Matched
SWCNT (N=7)	F344	Ad. Carcinoma (7)	Dr. Naiki Lab	Matched

図1 ラット肺がん・中皮腫より抽出された変異シグネチャー

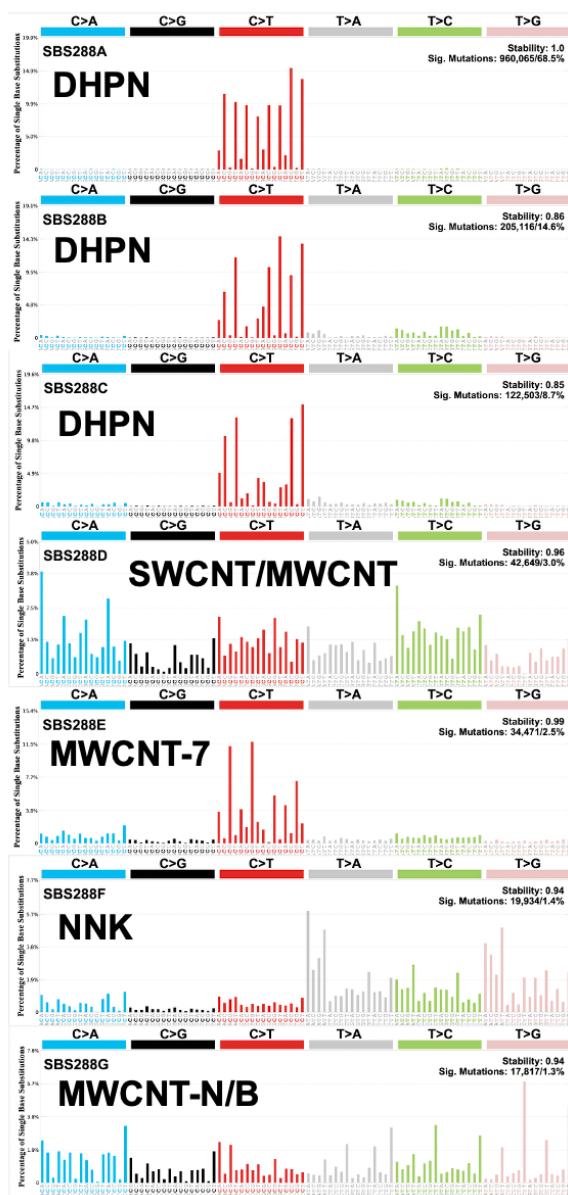
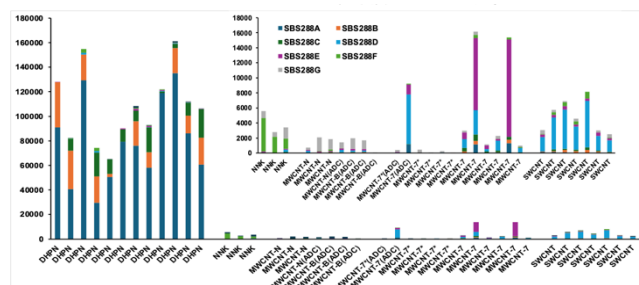


図2 サンプル毎の変異シグネチャー分布



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。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、DHPN由来のシグネチャーであるSBS_A~CはいずれもSBS11 (アルキル化剤由来) と酷似していることがわかった。MWCNT-7に由来すると思われるSBS_EはSBS1 (5-meCの自発的脱アミノ化) およ

びSBS87(チオプロリンによる化学療法)と類似していた。それ以外のシグネチャーはいずれも新規の変異シグネチャーである可能性が示唆された(表2)。

表2 ラットSBSシグネチャーとヒトSBSシグネチャーの類似性解析

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
RatSBS_A	DHPN	SBS11 (Alkylation)	0.99
RatSBS_B	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.84 0.80
RatSBS_C	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.80 0.86
RatSBS_D	SWCNT	SBS3 (Defective homologous recombination-based DNA damage repair) SBS5 (Clock like)	0.80 0.78
RatSBS_E	MWCNT-7	SBS1 (Spontaneous deamination of 5-meC) SBS7 (Thiopurine chemotherapy)	0.85 0.84
RatSBS_F	NNK	SBS85 (Indirect effects of activated-AID)	0.68
RatSBS_G	MWCNT-N/B	SBS9 (Pol eta somatic hypermutation activity) SBS40b (Unknown)	0.77 0.70

また、SBS_A (DHPN 由来) の C to T 変異、SBS_F (NNK 由来) の T to A および T to G 変異に強いストランドバイアス(転写鎖と非転写鎖でMFが異なる現象)が観察された(図3)。ストランドバイアスが観察された場合にはDNA付加体が起因となり当該変異シグネチャーを形成することなどが知られており、この情報はこれら化学発がん物質による発がんメカニズムをサポートする結果であると考えられる。さらに、SBS_Fは既報のNNKによる変異シグネチャーパターンとも非常に良く似ていることもわかった。

一方、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された(図4)。

図3 化学発がん物質によるラット肺がんの変異シグネチャー

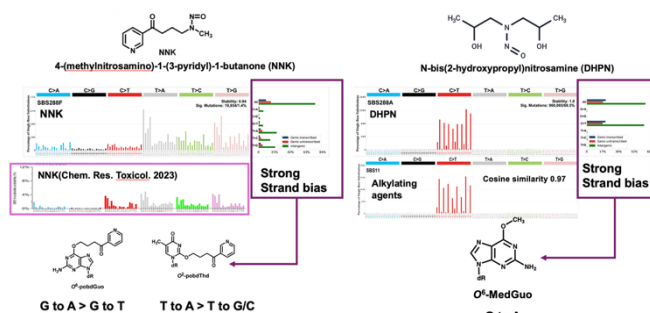
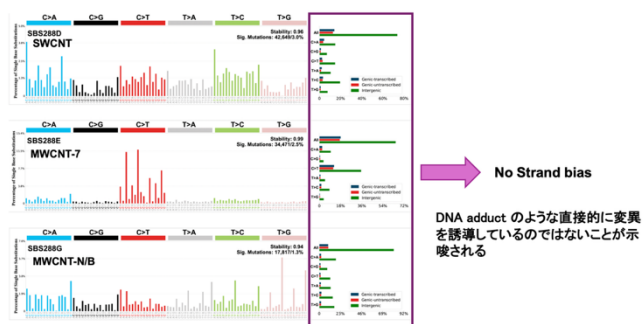


図4 CNTによるラット肺がん/中皮腫の変異シグネチャー



D. 考察

ラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体の全ゲノムシーケンスを行ない、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、7種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~G) を同定した。

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7とは大きく異なっており、これらナノマテリアル暴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。

現在、これらゲノム解析データを用いて、2塩基置換(DBS)変異や挿入・欠失(ID)の解析を実施している。

また、同様の構造体であるアスベストによるヒト肺がん・中皮腫では、特徴的なSBS変異シグネチャーは見つからず、むしろ大きな(染色体)構造変化が顕著であることが報告されている。MWCNTおよびSWCNTでも同様な現象が観察される可能性が考えられることから、構造異常(CV)についても解析を進める予定である。得られるデータは発がん機序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

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7とは大きく異なっており、これらナノマテリアル暴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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., **Totsuka Y***, Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells, *Genes & Environ.*, 2025 48(1): 2.
2. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., **Totsuka Y***, Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde, *Biomolecules*. 2025 15 (6): 878.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志、In vitro薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
3. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro*毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
4. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
5. 戸塚ゆ加里 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
6. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚ゆ加里、有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価 第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
8. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
9. 長谷川晋也、渡部光一、川口駿、垣内伸之、小川誠司、吉田健一、戸塚ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)
11. 戸塚ゆ加里、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とメカ

ニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025年10月、大阪)

12. 戸塚ゆ加里、次世代シーケンサー (NGS) とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演 (2025年11月、静岡)
13. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
14. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
15. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、大野 麻理奈、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株である 293 FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
16. 戸塚ゆ加里、オルガノイド技術を用いた環境化学物質の影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム (2025年12月、六本木、東京)
17. 戸塚ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
18. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro*遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
19. 今井正彦、小川心音、川西なつき、中山瑞穂、大島正伸、戸塚ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
20. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
21. 長谷川晋也、石ケ守 里加子、高橋賢吾、遠藤瑞葵、戸塚ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)

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