

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

細胞毒性に脆弱である中枢神経系を対象とした、  
ナノマテリアルが持つ有害作用の評価手法開発

(H25-化学-若手-009)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 入江 智彦

平成 26(2014)年 5 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

細胞毒性に脆弱である中枢神経系を対象とした,ナノマテリアルが  
持つ有害作用の評価手法開発----- 1

入江 智彦

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 16

(研究課題名) 細胞毒性に脆弱である中枢神経系を対象とした, ナノマテリアルが持つ有害作用の評価手法開発

研究代表者	入江 智彦	国立医薬品食品衛生研究所	薬理部
研究協力者	河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
研究協力者	伊佐間 和郎	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
研究協力者	宇佐見 誠	国立医薬品食品衛生研究所	薬理部
研究協力者	佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所	薬理部

#### 研究要旨

ナノマテリアルは次世代の新規素材として注目されており, 実際に活用が行われている。しかし, ナノマテリアルが健康被害を及ぼす可能性も示唆されており, ナノマテリアルの生体への安全評価は喫緊の課題である。生体組織において, 中枢神経系は特に毒性に対して脆弱なので, 中枢神経系へのナノマテリアルの影響検討が重要だと考えられる。それにも関わらず, 未だに効率的な有害作用の評価手法は開発されていない。

本年度は, 化粧品などに活用されているナノ粒子  $\text{TiO}_2$  と  $\text{ZnO}$  の神経細胞に与える影響を, 細胞毒性試験により検討した。神経細胞モデルである分化 PC12 細胞と 2 種類の細胞毒性評価法 (LDH アッセイと MTT アッセイ) を用いて実験を行った。  $\text{TiO}_2$  は細胞毒性を示さなかったが, 一方,  $\text{ZnO}$  は高濃度で細胞毒性を示した。この時の 50%細胞傷害率は約  $10 \mu\text{g/mL}$  である事が分かった。

この結果を元に, 次年度以降は PC12 細胞の分化に伴う神経突起伸展への影響を検討する事で, 神経細胞特有の構造と機能に対する金属ナノマテリアルの影響を解明し, ナノマテリアルの中枢神経系への影響の有無の予測に貢献できる評価手法を開発する。

#### A. 研究目的

ナノマテリアル (フラーレン, 酸化チタン等) は一般的に大きさが  $100 \text{ nm}$  未満と定義されている[1]。ナノマテリアルは従来の素材には無い有用機能を持つことから, 次世代の新規素材として注目されている。現在では工業用の用途に加えて, 化粧品

基剤など日用品にも実用化されており, 生活に必須な素材になりつつある。一方, ナノマテリアルが想定外の健康被害を及ぼす事が懸念されており[2], 実際にカーボンナノチューブや酸化チタンが発ガン性や炎症性を持つ可能性が数多く示唆されている[3]。それゆえ, ナノマテリアルの

健康への安全性評価は喫緊の課題である。

中枢神経系は他の組織と異なり、再生能力に乏しく、毒性に対して非常に脆弱である事が有名である。また、金属ナノマテリアルのうち、ZnOはラットを用いた実験で鼻腔内投与により脳内に移行する事が報告されている[4]。それにも関わらず、神経細胞に対するナノマテリアルの毒性評価に関する効率的な評価系は未だに確立されていない。それゆえ、ナノマテリアルの中枢神経系に対する有害作用の新規評価系を開発し、人体への健康影響を予測する事は、国民の健康を守るために非常に重要である。

本研究では、中枢神経系細胞を対象とした評価手法の構築を目指す。今年度は使用する神経細胞のモデルとして汎用されているPC12細胞を用いた。PC12細胞は株化細胞であり、胎児ラットの脳から作成する初代培養神経細胞よりも扱いが容易であり、かつ細胞増殖能を持つので実験に必要な細胞数を効率的に得る事が出来る。更には、神経突起伸展を神経成長因子 (NGF) 刺激により分化誘導できる。この特性を利用して神経突起伸展を指標にした化合物のスクリーニングにも用いることも可能である[5]。

平成 25 年度は各種金属ナノマテリアルが分化 PC12 細胞に毒性を与えるか否かを決定し、実際に与える場合はその濃度依存性を求める事を目標とした。

## B. 研究方法

### 1) 用いたナノマテリアル

・酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich, 721077, 平均 1 次粒子径 < 35 nm)

・酸化チタン TiO<sub>2</sub> (CIK ナノテックより提供, 平均 1 次粒子径 = 36 nm, メーカーカタログより)

の 2 種類を用いた。

### 2) 細胞株及び培養方法

PC12細胞は、国立衛研薬理部で液体窒素中に凍結保存されていたものを培養して用いた。PC12細胞は、10% heat-inactivated horse serum (非働化HS, GIBCO), 5% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化FBS, GIBCO), 50 units penicillin, 50 µg/ml streptomycin (GIBCO) を含む RPMI1640 培地 (GIBCO)にて、37°C, 5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。PC12細胞は、80%コンフルエントになった時に希釈して継代した。継代培養用には、コラーゲンIでコートされた培養プレート (BIOCOAT®, BectonDickinson) を用いた。

継代方法は以下の通りである。パスツールピペットで細胞をピペッティングして剥がした (トリプシンは使用しない)。遠沈管へ移し、注射針付きのシリンジで 20-40 回ピペッティングして細胞を出来るだけシングルセルにした。1,000rpm で 1 分間遠心し、上清を捨てて新しい培地に再浮遊させた。

### 3) PC12 細胞のマルチウェルへの播種



## と分化誘導

コラーゲン I でコートされた 96-well プレート (Thermo Fisher) に, 200  $\mu$ L 培地を分注した時に, PC12 細胞が 2,500 個/well の密度になるように細胞懸濁液を調製した. なお, この時の培地は低血清培地に NGF を加えた分化用培地を用いた: 1% heat-inactivated horse serum (非働化 HS, GIBCO), 0.5% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS, GIBCO), 50 units penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, を含む培地に NGF (mouseNGF2.5S, Alomone labs) が終濃度 50 ng/mL になるように添加した. 各 well には 200  $\mu$ L の細胞懸濁培地を分注し, 細胞を播種した. その後, 継代時と同様に 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した.

## 4) 分化 PC12 細胞へのナノマテリアル暴露

96-well プレートで培養した PC12 細胞を 1 日培養した後に ZnO ナノ粒子懸濁液と TiO<sub>2</sub> をそれぞれ別のウェルに添加した. 懸濁液には, 分化誘導時と同じ培地を使用した. ナノ粒子は 100  $\mu$ g/mL が最高濃度となるように, 段階希釈して各 well に添加した. 希釈には分化用培地を用いた. 各物質を添加後, インキュベーター内で培養を継続しながら 4 日間暴露した. 陽性対照として終濃度 0.1% TritonX-100 を用い, これを添加した well で細胞死を惹起させた.

## 5) 位相差顕微鏡を用いた細胞形態観察

PC12 細胞の位相差画像観察と撮影には, 倒立顕微鏡 ECLIPSE TS100 (NIKON), デジタルカメラ DN100 (NIKON), 20 倍対物レンズを用いた.

## 6) LDH アッセイ法を用いた細胞毒性試験

### 試薬

- LDH-Cytotoxic Test Wako (WAKO)
- PBS (-) (GIBCO)

### 方法

ナノマテリアルを 4 日間暴露した PC12 細胞プレートを用意した. 各 well より培地を 100  $\mu$ L ずつ分取し, 別の新しい 96-well プレートに移した. これに発色液 (WAKO のキット付属) を 25  $\mu$ L/well の割合で添加し, 室温で 30 分間インキュベートした. 希釈調整した反応停止液 (キット付属) を 50  $\mu$ L/well の割合で添加して発色反応を停止した. マイクロプレートリーダーで 560 nm の吸光度を測定した.

### 細胞傷害率の算定法

以下に示す計算式により求めた:

細胞障害率(%)

= (S-N)/(P-N)  $\times$  100

P = 検体での吸光度

N = 陰性対照での吸光度 (細胞

を播種していない well から分取した培地から得られる値)

P = 陽性対照での吸光度

求めた細胞障害率を縦軸に、被研物質の濃度を横軸にとってプロットし、生存率が 50% になる値を LD50 (50% 細胞傷害率) とした。

## 7) MTT アッセイ法を用いた細胞毒性試験

### 試薬

- MTT (Sigma-Aldrich)
- PBS (-)
- MTT 溶液 : MTT 25 mg に 5 mL の PBS (-) を加え溶解した。その後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌した。
- 0.04M HCl/イソプロピルアルコール : イソプロピルアルコールに 1/100 容量の 4M 塩酸を添加して作成した。

### 方法

標本は LDH アッセイ用に培地を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  の割合で回収した後、この細胞プレートをを用いて行った。MTT 溶液を各ウェルに 10  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。炭酸ガスインキュベーター内に戻し、3 時間呈色反応を行った。倒立顕微鏡で、細胞内に青紫色のホルマザン結晶が生成している事を確認した。各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  の PBS (-) を加え、1 分間ほどおいたのち、液を吸引除去した。

0.04M HCl/イソプロピルアルコールを 200  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。プレートをマイクロプレートミキサーにのせ、10 分間振動させて生成したホルマザンを溶解させた。マイクロプレートリーダーで 570 nm の吸光度を測定した。

### 細胞傷害率の算定法

下記の式により細胞生存率を算出した。これを種々の被検物質濃度に対してグラフに表し、生存率が 50% になる値を LD50 とした。

細胞生存率 (%)

$$= [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

As: 検体の吸光度 (細胞, 被検物質および MTT 溶液の入ったウェル)

Ac: 陰性対照の吸光度 (細胞および MTT 溶液の入ったウェル 被検物質無し)

Ab: ブランク吸光度 (培地および MTT 溶液の入ったウェル細胞無し)

## 8) 懸濁液中の金属酸化物ナノマテリアルの物性測定法

酸化金属ナノマテリアルは細胞分化用培地を用いて懸濁し、この粒径分布を動的光散乱光度計 (大塚電子 ELSZ-2NPA) により測定した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

## C. 研究結果

### 1) 凍結保存 PC12 細胞の突起伸展能の確認

PC12 細胞は低血清培地+NGF 存在下で分化誘導が惹起され、神経突起を伸ばす事が知られている[5]。国立医薬品食品衛生研究所・薬理部で凍結保存されていた PC12 細胞を使用するにあたり、この保存されていた細胞が突起伸展能を維持しているか否かを検討した。低血清培地+NGF 存在下 (研究方法参考) で 7 日間培養したところ、薬理部に保存されていた PC12 細胞は文化刺激に対して問題なく突起伸展を示すことが確認できた (Fig. 1)。

### 2) 分化 PC12 細胞を用いた細胞毒性評価系の確立

ナノマテリアルの神経細胞に対する毒性評価系の構築を行うに際し、多検体を用いて効率良く評価できる系として、96-well プレートを用いた実験系を行う必要があると考えた。そこで、細胞毒性評価にはマルチウェルプレートを使って実験実施が可能な LDH 法と MTT 法の 2 種類の方法を用いる事にした。

LDH 法は、まず初めに LDH (lactate dehydrogenase ; 乳酸脱水素酵素) の作用により、乳酸がピルビン酸に酸化されると同時に、補酵素 NAD が NADH に還元される。次に、サンプル中の LDH 活性に比例して産生される

NADH がジアホラーゼの酵素作用でトロブルーテトラゾリウムを還元して青紫色のジホルマザンを生成する。この呈色は生細胞数に比例するので、吸光度を測定する事で細胞生存率とこれから算出できる死細胞の割合の評価が可能となる。

MTT 法は、テトラゾリウム塩化合物である MTT が脱水素酵素の基質となる性質を利用する。細胞膜透過性の MTT は膜透過後に、ミトコンドリア内脱水素酵素により青色の色素 (ホルマザン) に還元される。この生成したホルマザン量は生細胞数に対応する。生成したホルマザン量は可溶化する事で LDH 法と同様にマイクロプレートリーダーによる吸光度測定で定量出来るのでマルチウェルプレートを用いて実験を行う事が出来る。

本研究室で、MTT 法と LDH 法のそれぞれを用いた分化 PC12 細胞の毒性評価系はこれまで確立されていなかった。そこで、金属ナノマテリアルを用いた実験を行う前段階として、陽性対照として細胞毒性を持つ Triton-X 100 (界面活性剤) を用いた MTT 法と LDH 法の実験手法確立を行った。その結果を Fig. 2 に示す。Triton-X 100 を終濃度  $1.0 \times 10^{-6}\%$  ~  $1\%$  になるように 96-well プレートに添加し、4 日分化培地による突起伸展を誘導した PC12 細胞に添加した。オーバーナイトで暴露させ、翌日 MTT アッセイと LDH アッセイを行った。その結果、それぞれの LD50 値は、 $8.6 \times 10^{-4}\%$ 、及び、 $1.4 \times 10^{-3}\%$  である事が分か

った。この結果は、本研究室で分化 PC12 細胞への細胞毒性評価がマルチウェルを用いて高効率で行えることを示している。

### 3) 金属ナノマテリアルの分化用培地における 2 次粒子径の測定

金属ナノマテリアルは水溶液中で凝集して 2 次粒子を形成する場合がある。そこで、分化用培地で金属ナノマテリアルを懸濁し、この環境における 2 次粒子径を、動的光散乱光度計により測定した (B, 研究方法を参考)。なお、PC12 細胞に暴露する時に使う濃度のうち、最も高い値 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) になるように調製した懸濁液を測定に用いた。その結果を表 1 に示す。分化培地中では  $\text{TiO}_2$  と  $\text{ZnO}$  の両方において、平均粒子径が 1 次粒子径よりも大きな値となっている事が分かった。この結果は  $\text{TiO}_2$  と  $\text{ZnO}$  のそれぞれが 2 次粒子として分化培地中に存在している事を示している。

### 4) 金属ナノマテリアルの分化 PC12 細胞に対する細胞毒性評価

最後に、 $\text{TiO}_2$  と  $\text{ZnO}$  の分化 PC12 細胞に対する細胞毒性を評価した。金属ナノマテリアルは分化用培地で希釈系列を作成し、分化誘導後 1 日目の細胞に添加した。その後、更にインキュベーター内で暴露させながら細胞を更に 4 日間培養を行った。その後、位相差顕微鏡観察と MTT アッセイ、LDH アッセイを行った。この結果を Fig. 3 と Fig. 4 にそれぞれ示した。

今回用いた中で最も高濃度であった、終濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $\text{TiO}_2$  を添加した場合、位相差顕微鏡観察で細胞の周囲に沈殿したナノマテリアルが確認できた (Fig. 3A)。それにも関わらず、陰性対照の細胞像 (Fig. 3B) と比較しても細胞形態に顕著な変化は観察されなかった。MTT アッセイと LDH アッセイを行った所、最も高濃度の  $\text{TiO}_2$  暴露でも細胞毒性は生じなかった (Fig. 3C, D)。この結果は  $\text{TiO}_2$  は分化 PC12 細胞に対して細胞毒性を示さない事を表している。

$\text{ZnO}$  を用いて同様の実験を行った所、 $\text{TiO}_2$  の場合とは全く異なった結果が得られた (Fig. 4)。終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 4 日間暴露を行っても細胞の形態には顕著な変化は生じなかった (Fig. 4A) が、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では明確な細胞形態の変化が観察された (Fig. 4B)。細胞毒性評価の結果、MTT アッセイ、LDH アッセイの両方の場合で終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で細胞毒性が生じた (Fig. 4C, D)。MTT アッセイと LDH アッセイによるそれぞれの LD50 値は、9.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び、9.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である事が分かった。

## D. 考察

金属ナノマテリアルの中で、今回は  $\text{TiO}_2$  と  $\text{ZnO}$  を用いた。 $\text{TiO}_2$  は主に化粧品 (ファンデーション、日焼け止め) などに用いられている (厚生労働省 HP, ナノマテリアルに係る安全対策のページ, <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano>



/nanopdf/sankou2.pdf より) . 本研究において,  $\text{TiO}_2$  は本研究で用いた最高濃度である,  $100 \mu\text{g/mL}$  でも細胞毒性を示さなかった (Fig. 3). この結果は,  $\text{TiO}_2$  は化粧品に含まれているが, これまで化粧品は顕著な健康被害を及ぼしていない事と相関があると推測される. ただ, 今回は  $\text{TiO}_2$  の分化用培地中での 2 次粒子径が  $100 \text{ nm}$  よりも大きな値を示していたので, ナノマテリアルとしての物性が減弱し, その結果, 毒性を示さなかった可能性もある (表 1) . それゆえ, 次年度以降に  $\text{TiO}_2$  に分散剤を追加で添加するなどを行い,  $100 \text{ nm}$  以下の 2 次粒子径が得られる条件を検討する必要があると考えられる.

ナノ粒子  $\text{ZnO}$  も工業製品や化粧品などに幅広く使われているが, 本研究においては  $10 \mu\text{g/mL}$  以上の濃度で分化 PC12 細胞に対して細胞毒性を示すことが分かった (Fig. 4). 近年, ナノ粒子  $\text{ZnO}$  が細胞毒性を示す原因の一つとして,  $\text{ZnO}$  が溶解して生じる  $\text{Zn}^{2+}$  が主な細胞毒性を及ぼしている事が報告されている[6]. それゆえ, 次年度以降は, 細胞毒性を及ぼした時の分化培地に含まれる  $\text{Zn}^{2+}$  の濃度を定量し, ナノ粒子  $\text{ZnO}$  が及ぼす細胞毒性を  $\text{ZnO}$  暴露の代わりに水溶性の  $\text{ZnCl}_2$  暴露で再現できるか否かを来年度以降, 検討することが重要であると考えられる.

## E. 結論

本研究において,

1) 分化 PC12 細胞を用いた金属ナノマテリアルの評価系として, MTT 法及び LDH

法を用いた細胞毒性評価系を確立した.

2) 分化 PC12 細胞の金属ナノマテリアルに対する細胞形態の変化を検討した所,  $\text{ZnO}$  の高濃度暴露で形態の変化が観察された. この変化は細胞毒性試験の結果と濃度域において比較可能であった. 一方,  $\text{TiO}_2$  は高濃度暴露でも細胞形態に変化は生じなかった. 細胞毒性試験においても毒性は認められなかった.

3) 今回は細胞毒性に着目して研究を行った. PC12 細胞は NGF 刺激により神経突起を伸展し, これは神経細胞における神経軸索伸長のモデルとなっている. 次年度以降はこの突起伸長への金属ナノマテリアル, 特に  $\text{ZnO}$  と  $\text{TiO}_2$  をの与える影響を検討する事を予定している. 神経軸索伸長は動物の発達期に特に盛んに行われるため, 突起伸長への影響検討は金属ナノマテリアルが胎仔や幼児期の成長段階における影響を考察する上で非常に重要な研究になると考えられる.

## F. 健康危険情報

なし.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Irie T\*, Matsuzaki Y, Sekino Y, and Hirai H\* (\*Co-corresponding authors)

*The Journal of Physiology*. 2014 Jan 1;592(Pt 1):229-247. Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje

cells.

2) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi, O. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2014 vol 39, 285-292. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos.

3) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Nakajima M. *Congenital Anomalies*. 2014 Feb;54(1):67-68. doi: 10.1111/cga.12036. Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions.

## 2. 学会発表

1) 入江 智彦, 松崎 泰教, 関野 祐子, 平井 宏和: 脊髄小脳変性症にみられる変異型 Kv3.3 チャネルは, 培養小脳プルキンエ細胞において細胞死と興奮性変化を引き起こす, Neuro2013 (京都, 2013. 6)

2) 原 宏士朗, 藤枝 智美, 入江 智彦, 三輪 秀樹, 岡 淳一郎, 白尾 智明, 花尻(木倉)瑠理, 合田 幸広, 栗原 正明, 関野 祐子: 光学測定法によるマウス扁桃体外側核の神経応答に対するカンナビノイド類の作用の解析, Neuro2013 (京都, 2013. 6)

3) 高橋 華奈子, 入江 智彦, 関野 祐子, 佐藤 薫: ドコサヘキサエン酸によるアストロサイトグルタミン酸トランスポーター

EAAT2 機能増強, Neuro2013 (京都, 2013. 6)

4) 宇佐見 誠, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 土井 守: 発生毒性物質がラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響に関する研究, 第 53 回日本先天異常学会学術集会 (大阪, 2013. 7)

**H.** 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## I. 謝辞

CIK ナノテックから試験に供試した TiO<sub>2</sub> を提供して頂きました. ここに謝意を表します.

## J. 参考文献

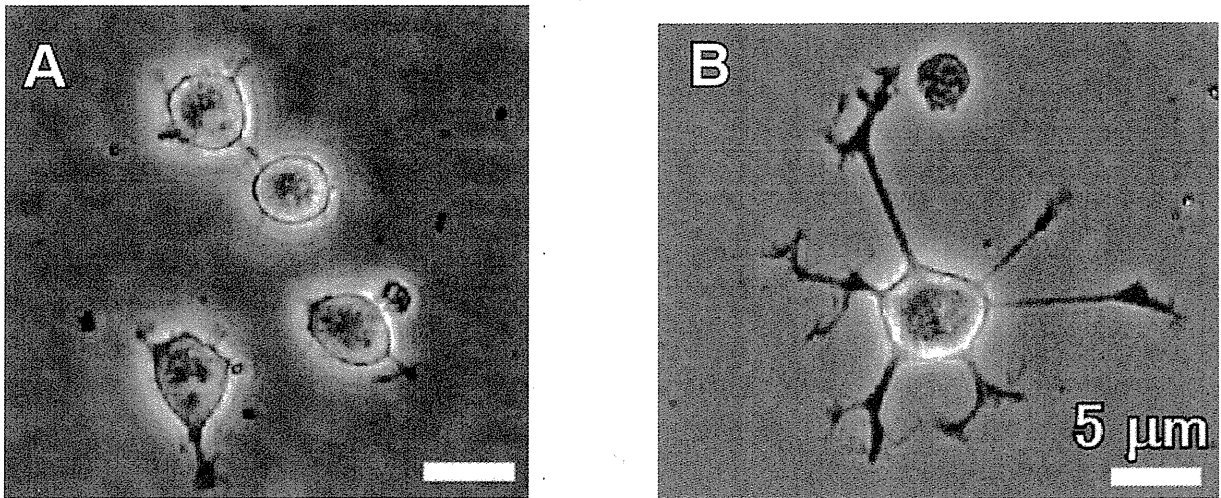
1. Whatmore, R.W., *Nanotechnology-what is it? Should we be worried?* *Occup Med (Lond)*, 2006. **56**(5): p. 295-9.

2. Service, R.F., *Nanotoxicology. Nanotechnology grows up.* *Science*, 2004. **304**(5678): p. 1732-4.

3. Takagi, A., et al., *Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube.* *J Toxicol Sci*, 2008. **33**(1): p. 105-16.

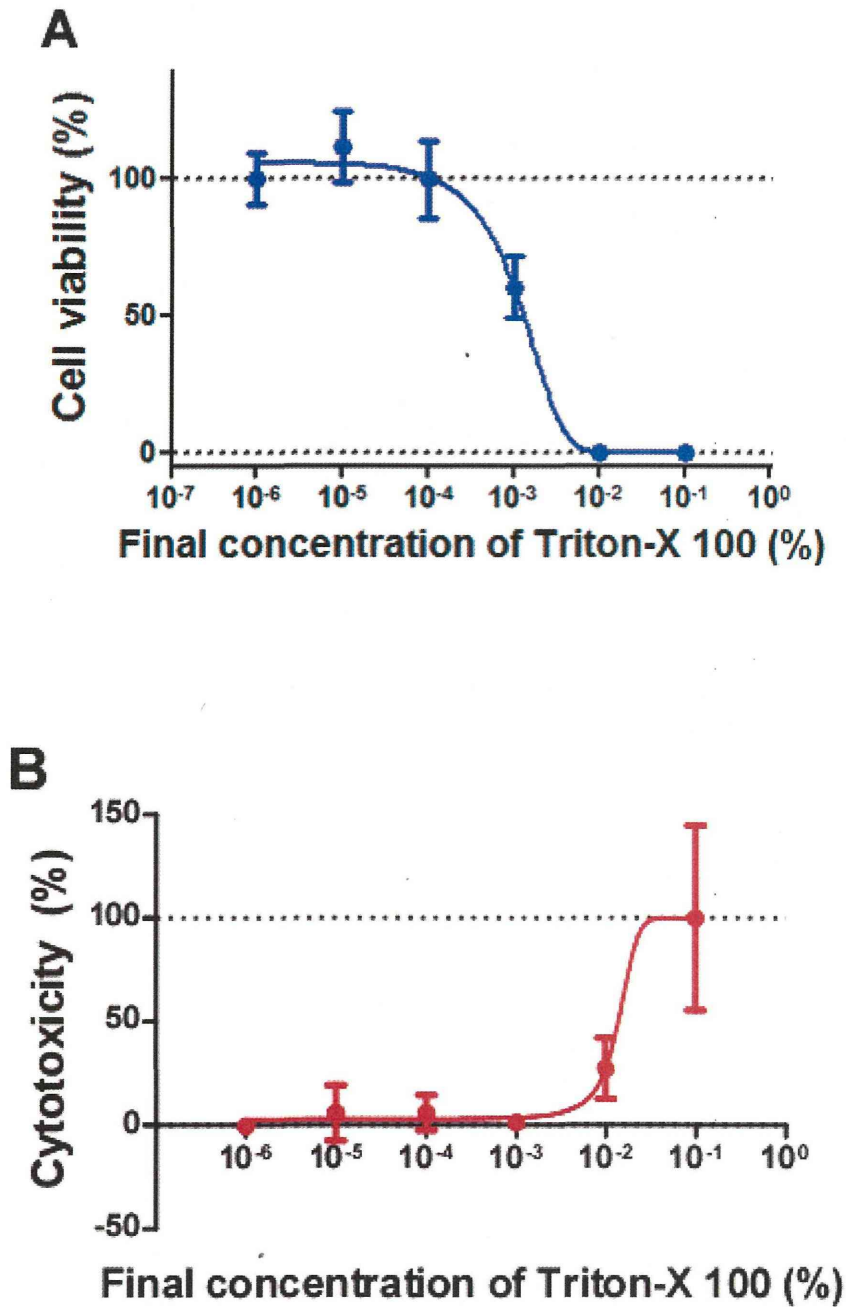
4. Kao, Y.Y., et al., *Demonstration of*

- an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo.* J Mol Neurosci, 2012. **48**(2): p. 464-71.
5. Das, K.P., T.M. Freudenrich, and W.R. Mundy, *Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures.* Neurotoxicol Teratol, 2004. **26**(3): p. 397-406.
  6. Song, W., et al., *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles.* Toxicol Lett, 2010. **199**(3): p. 389-97.



**Fig. 1**

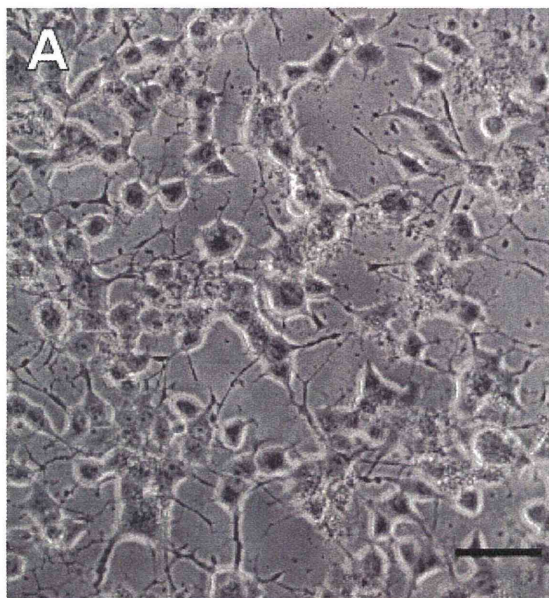
分化誘導前 (A) と分化誘導後 (B: 低血清培地+NGF 存在下,7 日間培養) の PC12 細胞. 位相差顕微鏡を用いて画像観察と撮影を行った. B において, 神経突起の成長が観察できる.



**Fig. 2**

界面活性剤である Triton-X 100 を用いた, PC12 細胞の MTT 法による生細胞測定結果 (A) と LDH 法による細胞障害性の測定結果 (B) . 各点  $n = 3$  で行った. データポイントとエラーバーは平均値 $\pm$ 標準誤差を示す. 横軸には Triton-X100 の最終濃度をプロットした.

TiO<sub>2</sub> 100 μg/mL in medium



Negative control (w/o NP)

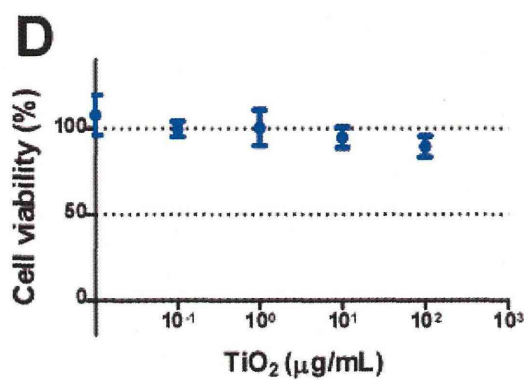
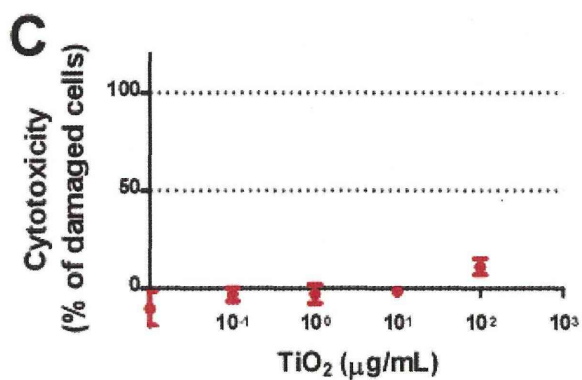
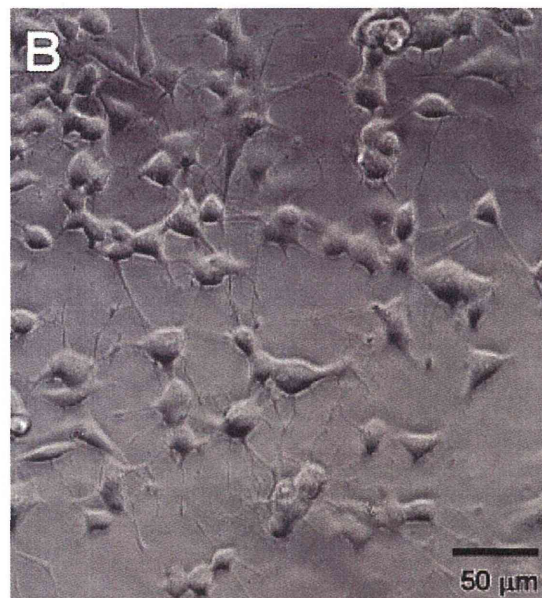
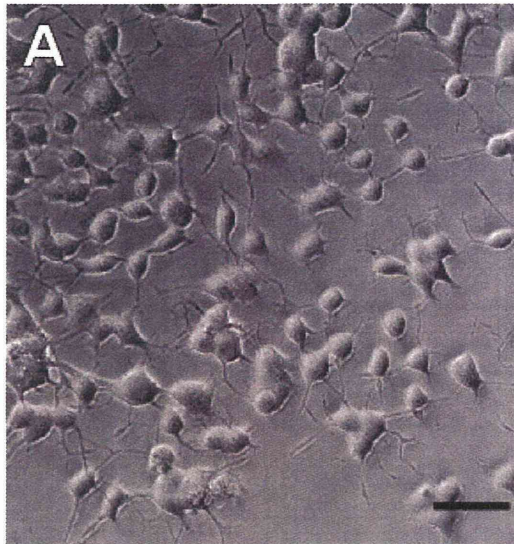


Fig. 3

TiO<sub>2</sub> 暴露を行った分化 PC12 細胞の位相差顕微鏡画像 (A, B), MTT アッセイの結果 (C), LDH アッセイの結果 (D). w/o NP: ナノ粒子無し. C, D において, 実験は各点  $n=5$  で行った. データポイントとエラーバーは平均値±標準誤差を示す. 横軸には使用した TiO<sub>2</sub> の最終濃度をプロットした.



ZnO 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in medium



ZnO 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in medium

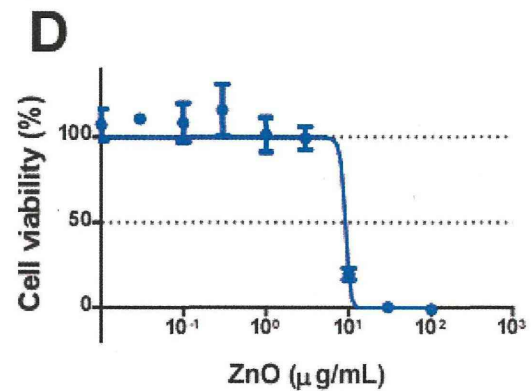
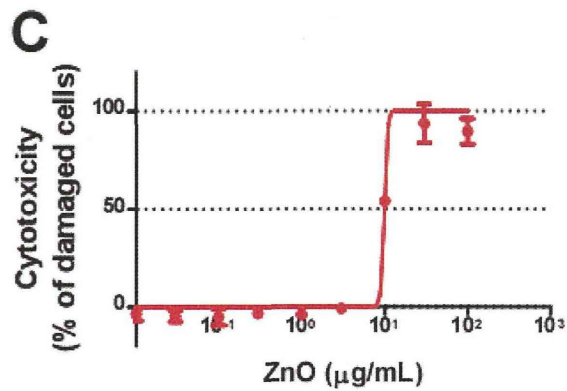
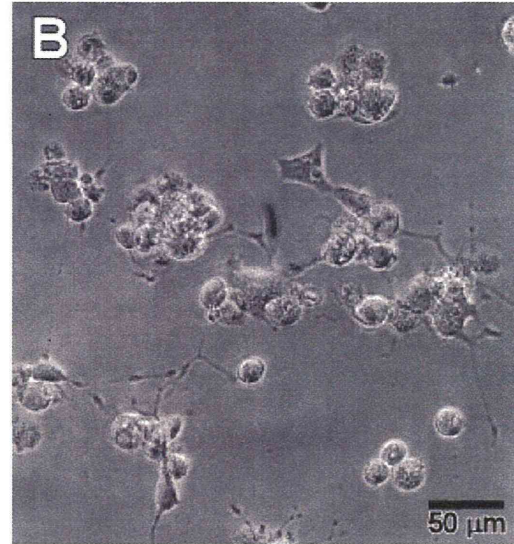


Fig. 4

ZnO 暴露を行った分化 PC12 細胞の位相差顕微鏡画像 (A, B), MTT アッセイの結果(C), LDH アッセイの結果 (D). C, D において, 実験は各点  $n = 5$  で行った. データポイントとエラーバーは平均値 $\pm$ 標準誤差を示す. 横軸には使用した  $\text{TiO}_2$  の最終濃度をプロットした. このプロットに対して C は  $Y = 100/[1 + 10^{(\text{Log LD50} - X)]$ , D は  $Y = 100/[1 + 10^{(X - \text{Log LD50})}]$  の式で曲線をフィットさせて LD50 値を求めた. このフィットは Graphpad Prism 5 ソフトウェアを用いて行った.

表1. 金属ナノマテリアルの各頻度分布における最大ピークの平均粒子径

	1次粒子径 (nm; メーカーのデータより)	散乱強度分布 (nm)	個数分布 (nm)
TiO <sub>2</sub>	36	321 ± 33	1093 ± 53
ZnO	<35	176 ± 21	691 ± 82

散乱強度分布と個数分布は、各金属ナノマテリアルを分化用培地で100 µg/mLに懸濁して測定した。

測定は同一資料を繰り返し3回測定し、その値より平均値±標準誤差を求めた。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Irie T, Matsuzaki Y, Sekino Y, Hirai H	Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells.	The Journal of Physiology.	592 (Pt 1)	229-247	2014
Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi, O.	Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos.	The Journal of Toxicological Sciences.	39	285-292	2014
Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Nakajima M.	Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions.	Congenital Anomalies.	54(1)	67-68	2014



## Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells

Tomohiko Irie<sup>1,2</sup>, Yasunori Matsuzaki<sup>2</sup>, Yuko Sekino<sup>1</sup> and Hirokazu Hirai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Setagaya 158-8501, Japan

<sup>2</sup>Department of Neurophysiology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, 371-8511, Japan

### Key points

- The cerebellum plays crucial roles in controlling sensorimotor functions, and patients with spinocerebellar ataxia type 13 exhibit cerebellar atrophy and cerebellar symptoms.
- The disease is an autosomal dominant disorder caused by missense mutations in the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv3.3, which is expressed intensely in the cerebellar Purkinje cells, the sole output neurons from the cerebellar cortex.
- Here, we examined how these mutations cause the cerebellar disease by lentiviral expression of the mutant Kv3.3 in mouse cultured Purkinje cells.
- Expression of the mutant Kv3.3 suppressed outward currents, broadened action potentials and elevated basal intracellular calcium concentration in Purkinje cells. Moreover, the mutant-expressing Purkinje cells showed impaired dendrites and extensive cell death, both of which were significantly rescued by blockade of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels.
- These results suggest that Purkinje cells in the patients also exhibit similar abnormalities, which may account for the pathology of the disease.

**Abstract** The cerebellum plays crucial roles in controlling sensorimotor functions. The neural output from the cerebellar cortex is transmitted solely by Purkinje cells (PCs), whose impairment causes cerebellar ataxia. Spinocerebellar ataxia type 13 (SCA13) is an autosomal dominant disease, and SCA13 patients exhibit cerebellar atrophy and cerebellar symptoms. Recent studies have shown that missense mutations in the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv3.3 are responsible for SCA13. In the rodent brain, Kv3.3 mRNAs are expressed most strongly in PCs, suggesting that the mutations severely affect PCs in SCA13 patients. Nevertheless, how these mutations affect the function of Kv3.3 in PCs and, consequently, the morphology and neuronal excitability of PCs remains unclear. To address these questions, we used lentiviral vectors to express mutant mouse Kv3.3 (mKv3.3) channels harbouring an R424H missense mutation, which corresponds to the R423H mutation in the Kv3.3 channels of SCA13 patients, in mouse cerebellar cultures. The R424H mutant-expressing PCs showed decreased outward current density, broadened action potentials and elevated basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> compared with PCs expressing wild-type mKv3.3 subunits or those expressing green fluorescent protein alone. Moreover, expression of R424H mutant subunits induced impaired dendrite development and cell death selectively in PCs, both of which were rescued by blocking P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in the culture conditions. We therefore concluded that expression of R424H mutant subunits in PCs markedly affects the function of endogenous Kv3 channels, neuronal excitability and, eventually, basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, leading to cell death. These



results suggest that PCs in SCA13 patients also exhibit similar defects in PC excitability and induced cell death, which may explain the pathology of SCA13.

(Received 28 August 2013; accepted after revision 5 November 2013; first published online 11 November 2013)

**Corresponding authors** T. Irie: Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Email: irie@nihs.go.jp or H. Hirai: Department of Neurophysiology, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Shouwa-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-8511, Japan. Email: hirai@gunma-u.ac.jp

**Abbreviations** ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AF, AlexaFluor; a.u., arbitrary unit; calbindin, calbindin D-28k; DIV, days *in vitro*; DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione; G, conductance; GFP, green fluorescent protein; hKv3.3, human Kv3.3;  $I_{Na}$ ,  $Na^+$  current;  $k$ , a slope factor; mKv3.3, mouse Kv3.3; MSCV, murine embryonic stem cell virus; PBS-XCG, PBS containing 0.3% Triton X-100, 0.12%  $\lambda$ -carrageenan, 1% goat serum and 0.02% sodium azide; PCs, Purkinje cells; P2A, 2A peptide sequence from porcine teschovirus-1;  $R_{max}$ , maximal fluorescence ratio;  $R_{min}$ , minimal fluorescence ratio; RT, room temperature; SCA13, spinocerebellar ataxia type 13; sEPSCs, spontaneous excitatory postsynaptic currents;  $\tau_{act}$ , activation time constant;  $\tau_{inact}$ , inactivation time constant;  $\tau_{recovery}$ , recovery time constant; VSV-G, vesicular stomatitis virus G protein; WT, wild-type.

## Introduction

In most excitable cells, the high  $K^+$  permeability arises from delayed-rectifier  $K^+$  channels of the Kv class (Hille, 2001). One of the Kv subfamilies, known as Kv3, has generated particular interest because of its unique electrophysiological properties (Rudy & McBain, 2001). The Kv3 channels are high-voltage-activated  $K^+$  channels, and they exhibit fast activation and deactivation kinetics; therefore, Kv3 channels are activated during action potential depolarization and are indispensable for high-frequency firing in many neurons, such as fast-spiking cortical interneurons and cerebellar Purkinje cells (PCs; Erisir *et al.* 1999; McKay & Turner, 2004). Rodents and humans possess four Kv3 genes: *Kv3.1–3.4*. The Kv3 channels are composed of four pore-forming subunits and form heterotetrameric channels by combination of Kv3 members. In the rodent brain, Kv3.3 mRNA and protein are abundantly expressed in the cerebellum, in which the mRNA is most intensely expressed in PCs (Weiser *et al.* 1994; Chang *et al.* 2007). Interestingly, Kv3.3-deficient mice show normal PC morphology and no ataxic phenotype (Joho *et al.* 2006; Hurlock *et al.* 2008; Zagha *et al.* 2010).

The numerous diseases arising from channel dysfunction (channelopathies) illustrate the importance of ion channels to the organism. To date, missense mutations in more than 60 ion-channel genes have been associated with human disease (Ashcroft, 2006). Recently, missense mutations in the *KV3.3* gene (also known as *KCNC3*), which encodes human Kv3.3 (hKv3.3) channels, were linked to autosomal dominant spinocerebellar ataxia type 13 (SCA13). Spinocerebellar ataxia type 13 is accompanied by cerebellar symptoms and by cerebellar atrophy, and three different mutations (R420H, R423H and F448L) have been identified, although the neurodegenerative changes in the post-mortem cerebellum have not been investigated (Waters *et al.* 2006; Figueroa

*et al.* 2010). In *Xenopus* oocyte expression systems, coexpression of the R420H or R423H mutant subunits with wild-type (WT) hKv3.3 suppresses the current by a dominant-negative mechanism. Given the intense Kv3.3 expression in rodent PCs and the cerebellar atrophy in SCA13 patients, these mutations are expected to affect the neuronal excitability and morphology of PCs severely. Recently, Issa *et al.* reported that zebrafish expressing mutant zebrafish Kv3.3 subunits (homologous to the F448L mutant) in spinal motoneurons, which endogenously express Kv3.3, show defective axonal pathfinding (Issa *et al.*, 2012). However, as they used a motoneuron-specific enhancer to drive expression, these zebrafish display no distinct cerebellar abnormality. Therefore, the pathology of SCA13 has not been elucidated, and other methodological approaches are needed.

In the present study, to investigate the effects of *Kv3.3* mutations in PCs, we expressed mouse Kv3.3 (mKv3.3) channels harbouring the R424H missense mutation, which corresponds to the R423H mutation in hKv3.3, using a lentivirus system in mouse cerebellar cultures. Immunohistochemical analysis revealed that expression of R424H mutant subunits induced impaired dendrite development and cell death in PCs by 11 days *in vitro* (DIV) without significant alteration in granule cells. To examine the effects of R424H mutant subunits on the electrophysiological properties and free  $[Ca^{2+}]_i$  of PCs, we performed whole-cell patch-clamp recordings and calcium imaging from PCs at DIV 8–10. Action potential duration and basal  $[Ca^{2+}]_i$  were significantly increased in R424H mutant-expressing PCs compared with PCs expressing WT mKv3.3 or those expressing green fluorescent protein (GFP) alone. Furthermore, blockade of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels by  $\omega$ -agatoxin IVA in the culture conditions rescued the dendritic maldevelopment and cell death in PCs caused by R424H mutant subunits.



## Methods

### Ethical approval

Newborn (i.e. within 24 h after birth) mice (ICR strain) of both sexes were used for cerebellar cultures. *Xenopus* oocytes were collected from anaesthetized *Xenopus laevis*. These animals were used according to the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals approved by the guidelines of the National Institute of Health Sciences, Japan. All experiments also complied with *The Journal of Physiology* policy and UK regulations on animal studies (Drummond, 2009).

### Molecular biology

The mouse cerebellum expresses the *Kv3.3b* gene, which is an alternatively spliced isoform of *mKv3.3* (Goldman-Wohl *et al.* 1994). *mKv3.3* cDNA that is nearly identical to *Kv3.3b* (Desai *et al.* 2008) was obtained as a kind gift from Dr Leonard K. Kaczmarek (Yale University, New Haven, CT, USA). The amino acid identity between hKv3.3 (Gene Accession number: AF055989) and mKv3.3 is 89%, and the sequence of the S4 transmembrane segment showed a complete match between the two species (Supplemental Fig. S1). To date, several reports have shown that there are three types of missense mutations (R420H, R423H and F448L) in hKv3.3 channels in distinct SCA13 pedigrees (Waters *et al.* 2006; Figueroa *et al.* 2010, 2011). In the present study, we focused on the R423H mutation. The S4 transmembrane segment of mKv3.3 has an arginine residue at position 424, which corresponds to the arginine at position 423 in hKv3.3. The arginine of mKv3.3 was replaced with histidine by overlap PCR using PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan). The nucleotide exchanges were c.1271G>A and c.1272T>C. Wild-type and R424H mutant *mKv3.3* cDNA were subcloned in pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the mutation was confirmed by sequencing.

For lentiviral vector-based gene expression, the murine embryonic stem cell virus (MSCV) promoter, which drives PC-predominant expression of a transgene in cerebellum, was used (Hawley *et al.* 1994; Hanawa *et al.* 2004; Torashima *et al.* 2006; Takayama *et al.* 2008). A Kozak translation initiation sequence and 2A peptide sequence from porcine teschovirus-1 (P2A) for efficient cleavage of polyproteins were placed at the N- and C-termini of WT and R424H mutant *mKv3.3* cDNA, respectively (Szymczak *et al.* 2004; Torashima *et al.* 2009). Then, stop codons were removed using the following PCR primer pair: a 5' primer with an *AgeI* site and Kozak sequence (bold; 5' primer, **CGACCGGTGCCACCATGCTCAGTTCAGTGTGCGT**) and a 3' primer with an *AgeI* site and P2A (bold; 3' primer, **CGACCGGTGGCCCGG**

**GGTTTTCTTCAACATCTCTGCTTGCTTTAACAGAGAGAAGTTCGTGGCGCCGGAGCCGAGGATGGAGGGCAGGGTTCG**). A Gly-Ser-Gly linker (underlined in the 3' primer) was also placed between the N-terminus of a WT (or R424H mutant) mKv3.3 sequence and P2A using the 3' primer. This linker improves the cleavage efficacy of the P2A (Szymczak *et al.* 2004). The PCR products were subcloned in-frame into the *AgeI* site of pCL20c MSCV-GFP, which is present 8 bp upstream from the translation initiation site of GFP. Finally, lentiviral transfer vectors for the experiments (pCL20c MSCV-WT-P2A-GFP and pCL20c MSCV-R424H-P2A-GFP) were obtained, and the inserted sequences were verified by sequencing.

### Lentiviral vector preparation

Vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G) pseudotyped lentiviral vector particles were produced by transient transfection of HEK 293T cells with viral plasmids as described previously (Torashima *et al.* 2006). In brief, HEK 293T cells were transfected with a mixture of the following four plasmids: pCAGkGP1R, pCAG4RTR2, pCAG-VSV-G and the lentiviral transfer vector plasmid (pCL20c MSCV-GFP, pCL20c MSCV-WT-P2A-GFP or pCL20c MSCV-R424H-P2A-GFP). The medium containing viral particles was concentrated by ultracentrifugation and resuspended in 70  $\mu$ l of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). The infectious titres of the virus were determined as follows: virus stocks were added to HEK 293T cells in the presence of Polybrene (6  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After 4 days, GFP-positive cells were counted using a Tali Image-Based Cytometer (Invitrogen), and the titres were adjusted to  $1.0 \times 10^{10}$  or  $0.5 \times 10^{10}$  transduction units/ml.

### Cerebellar culture and lentivirus-mediated gene expression

Cerebellar cultures were prepared according to our previous protocol with some modifications (Hirai & Launey, 2000). After the mice were killed by decapitation, the cerebella of newborn mice were quickly removed and treated with 2 ml of a papain digestion solution containing 40 units of papain (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), 2 mM L-cysteine hydrochloride and 1 mM EDTA in Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-free Hank's balanced salt solution (pH 7.0; Gibco, Grand Island, NY, USA; Tabata *et al.* 2000). Then, the cerebella were dissociated by trituration in Hank's balanced salt solution containing 0.05% (w/v) DNase (Sigma-Aldrich) and 12 mM MgSO<sub>4</sub>. After centrifugation (180  $\times$  g, 5 min), the cells were resuspended in DMEM/F12 (Gibco)-based medium containing 4.2 mM