

201524014A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価
及びリスク低減化に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究 報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

平成 28 (2016) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価

及びリスク低減化に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成 28 (2016) 年 3 月

渡邊 昌俊	国立大学法人横浜国立大学大学院 工学研究院 教授
林 幸彦朗	国立大学法人名古屋大学未来材料・システム研究所 助教
戸塚 ゆ加里	国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長
中江 大	東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
花方 信孝	国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長
河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

目 次

I. 総括研究年度終了報告

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

渡邊 昌俊 1

II. 分担研究年度終了報告

1. 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築・エピジェネティク

スマーカーの検索・ナノマテリアルの細胞内動態の解析 渡邊 昌俊 11

2. ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション 林 幸壱朗 19

3. ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築・共培養系及び 3D

皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築 戸塚 ゆ加里 22

4. *In vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証 中江 大 25

5. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析 宮島 敦子 27

6. ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析 花方 信孝 38

7. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析 河上 強志 45

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 59

IV. 研究成果の刊行物・別刷 63

I. 総括研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

研究代表者 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 工学研究院 教授

本研究は、ナノマテリアルの適切な物性解析、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。また、本研究では、消費者が日常生活で曝露している、ある程度の安全性の知見が集積されているナノマテリアルである金・銀・酸化チタン・酸化亜鉛・酸化鉄等の金属ナノ粒子を対象とする。平成27年度（3年計画の1年目）は、次のような成果を得た。ナノマテリアルの毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後、2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規 *in vitro* リスク評価系として、*in vivo* 実験 (*gpt delta mouse*)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功したAu NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、ナノマテリアルの皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo* 系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認められた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした（概略図）。

研究分担者：

林 幸孝朗 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教
戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究
分野 ユニット長
中江 大 東京農工大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 分子毒性学
(医療機器部) 室長
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 生物工学
(ナノテクノロジー融合ステーション) ステーション長
河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 衛生化学
(生活衛生化学部) 主任研究官

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 室長
小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
煙山 紀子 東京農工大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

A. 研究目的

ナノマテリアルの社会的受容の実現には、十分なリスク評価を行い、仮にリスクがある場合、ベネフィット・リスクバランスを考慮した適切なリスク低減が必要である。また、動物愛護の3Rの観点から、動物実験

代替法の開発も必要である。本研究は、ナノマテリアルの物性解析後、新規*in vitro*評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。

ナノマテリアルの気道毒性の*in vitro*リスク評価は主として肺胞上皮由来細胞の単独培養系によるが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージの貪食と液性因子放出の関与が示唆されている (*Part.Fibre.Toxicol.*6(1),23, 2009;*Genes Environ.*,33,14-20,2011; *Nanotoxicology*,7,452-61, 2013)。本研究グループは、マクロファージ由来細胞 (RAW264) との共培養で、肺胞上皮由来細胞 (A549) に対するカオリンの遺伝毒性の増強を確認している。従って、本研究グループは、上皮細胞単独の*in vitro*評価法が不十分であり、生体模倣の新規*in vitro*試験系の構築の必要性を考えた。本研究は、ナノマテリアルの新規*in vitro*リスク評価系及びマーカーの確立とナノマテリアルリスク低減方策の策定を目指す。

具体的には、(1)ナノマテリアルのリスク評価のための新規*in vitro*評価系およびマーカーの開発(ナノマテリアルの DNA 損傷性新規評価系およびマーカーの開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの気道毒性新規評価系の開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの皮膚毒性新規評価系の開発)、(2)従来の*in vitro*リスク評価系との比較検討、*in vivo*動物実験による当該リスク評価系の検証、(3)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(4)当該評価結果に基づくリスク低減化方策の考案と検証を柱とする。

平成 27 年度、主として各種細胞の共培養系、各種細胞と組織切片の共培養系(切片担体培養系)、再構成ヒト皮膚培養系 (3D-skin model) 構築の基礎的解析および microRNA 等の網羅的解析によるマーカーの抽出を行

った。

以下に各分担研究の成果の概要を記載する。

B. 研究方法

1)ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション(林) :

本年度は、金(Au)、銀(Ag)ナノ粒子(NPs)の合成および評価を行った。HAuCl₄ 水溶液と臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、遠心分離、水への再分散を繰り返し、Au NPs を合成した。クエン酸三ナトリウム水溶液に AgNO₃ 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、Ag NPs を合成した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱 (DLS) にて粒径分布を評価した。

2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上) :

異なる一次粒子径の酸化ニッケル (II)(NiO) NPs より同程度の二次粒子径の懸濁液の作成と評価を行った。NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) および Ni NPs (一次粒子径: 5~20 nm) に Tween 80 含む Milli-Q 水を加え、サイズの異なる 3 種類のジルコニアボールを用いて、遊星ボールミル型粉碎機で懸濁液を調製した。粉碎後、10 mg/mL (または 1 mg/mL) の懸濁原液を作成した。懸濁原液を 10 % FBS-MEM で、毒性試験用ナノ粒子懸濁液を調製した。これらの懸濁原液について、平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を DLS にて測定した。

3)ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析(宮島) :

本年度は、酸化亜鉛(ZnO) NPs の懸濁液中の特性および細胞毒性・免疫応答解析を行った。酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich と Alfa Aesar)の懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位は、DLS により測定した。THP-1 細胞における細胞毒性は、ATP 法により評価した。Interleukin-8 (IL-8) 、 Tumor Necrosis

Factor- α (TNF- α)の測定は、ELISA Kit により測定した。THP-1 細胞の活性化マーカー CD86, 54 の測定は、FITC ラベルされた3種類の抗体にて細胞を染色後、Flow Cytometry により解析した。

4) ナノマテリアルによるDNAの直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築(戸塚)：

①ナノマテリアルによるDNAの直接及び間接的損傷性評価系の構築：ICRマウスに非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)懸濁液の経気道的曝露実験を行い、摘出した肺組織の消化後、水-メタノールの溶媒系を用いLC-QToF-MSでDNA付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が Fe_3O_4 NPs投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされ、これら付加体の同定は既に構築済みのDNA付加体リストとの比較により行った。

②共培養系及び3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：GDL1とRAW264を共培養し、 Fe_3O_4 NPsを各細胞単独に、あるいは両細胞に24時間曝露した後、*gpt* 遺伝子の変異を解析した。

5) *in vivo*動物実験による新規*in vitro*リスク評価系の有効性の検証(中江)：

本年度は、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規*in vitro*スクリーニング評価系を開発に着手した。市販の再構成ヒト皮膚培養系について情報収集・精査後、本研究で使用すべき再構成ヒト皮膚培養系を選定した。また、LabCyte EPIモデルを用い、Au NPs各濃度で24時間曝露し、細胞毒性をLDH assayで解析した。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索(花方、渡邊)：

本年度は、非修飾/カルボキシル基修飾磁

性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOH)をA549細胞に24時間あるいは72時間曝露し、RNAを回収し、miRNA microarrayを用いて網羅的発現およびクラスター解析を行った。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)：

①切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築：過去の切片担体培養の条件で、A549細胞の試行培養を行った。既に作成された凍結切片を用いて(本学動物実験取扱い委員会に過去提出済み)、担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、各臓器のスライドガラスを準備し、細胞を播種し、接着性と増殖性を解析した。

②ナノマテリアルの細胞内動態の解析：前立腺癌細胞株DU145に対して、 Fe_3O_4 NPsと Fe_3O_4 NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞膜上の状態を観察した。また、Alamar Blue assayを用いて、生存率を求めた。活性酸素種(ROS)の測定はCM-H₂DCFDAを使用した。また、Western blottingで、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究グループでは、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従い行う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行う。次年度以降の必要とされる動物実験は、各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

1) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs 濃度が 2 mg/mL の溶液を合成できた。Ag NPs 濃度が 0.02 mg/mL 以下では均一な溶液が得られたが、これ以上の濃度では Ag NPs が凝集・沈降を示した。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

作成した NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) は、調製後速やかに凝集してしましたが、Ni NPs は、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できた。

3) ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

2 種類の ZnO NPs (Sigma 及び Alfa) は、一次粒子径が各 <35 nm, 40 nm、水懸濁液中 (10 mg/mL) での平均粒子径は各 66 nm, 165 nm 等と性状が異なり、血清含有培地懸濁液中での異なる二次粒径変化を認めた。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、ZnO (Sigma) が ZnO (Alfa) より強かった。THP-1 細胞の産生サイトカイン量や CD54 の活性化も 2 種の Zn NPs で異なることが観察された。

4) ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

①非投与群と比べて、Fe₃O₄ NPs 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が Fe₃O₄ NPs 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC (εdC) などであることが示された。

②Fe₃O₄ NPs の GDL1 細胞単独曝露に比べ、RAW264 単独及び両細胞に曝露させた時の変異頻度が優位に上昇することがわかった。さらに、Fe₃O₄ NPs 曝露による変異スペクトラムの解析では、Fe₃O₄ NPs を両細胞に曝露時のスペクトルは、*gpt delta* マウスへの

Fe₃O₄ NPs 曝露時の肺の変異スペクトルに類似することを認めた。

5) *in vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証：

2 種類の再構成ヒト皮膚培養系を用いることに決定した：POCA ヒト 3D HADA モデル (DS ファーマ・バイオメディカル；ヒト幹細胞由来のメラノサイト、ヒト・ケラチノサイト、ヒト線維芽細胞による表皮・真皮の構成)、LabCyte EPI モデル (J-TEC；ヒト正常皮膚細胞による表皮のみの構成)。Au NPs 曝露実験では、LDH assay により、最大用量でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

全 1374 個の miRNA のうち、1 つ以上のサンプルでシグナルが検出された miRNA は 118 個あった。これらについて階層型クラスタリングを行い、heat map と clustering tree を作成した。この miRNA 発現パターンの類似性から推測されたサンプルの clustering tree において、2 つの大きなグループが検出された。いずれのグループも NPs に曝露された細胞の miRNA の発現パターンが、曝露されていない細胞の発現パターンとは異なっていることや非修飾 NPs と修飾 NPs に曝露された細胞での miRNA 発現パターンは異なることを認めた。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

①A549細胞の担体培養を行ったが、総じて細胞接着が悪く、その後の十分な増殖も認められなかった。

②ナノマテリアルの細胞内動態の解析：
Fe₃O₄NPs, Fe₃O₄NPs-COOHのDU145細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に減少し

たが、200 µg/mL曝露時には有意に低下した。また、ROS産生はFe₃O₄NPsでは濃度依存的に増加、Fe₃O₄NPs-COOHは抑制されていた。AFMでは、細胞表面に付着している粒子凝集体の粒径については、非修飾、修飾粒子において顕著な違いは確認されなかった。また、細胞内の生存シグナルであるNFκBの発現量は、Fe₃O₄NPsでは抑制され、Fe₃O₄NPs-COOHでは増強されるのを認めた。

D. 考察

1) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs は、本研究グループ内で供給出来るレベルであることを確認した。Ag NPs は約 2 mg/mL の銀ナノ粒子溶液を合成するため、新しい合成法を開発することになった。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

NiO NPs について、調製方法の検討が必要と考えられた。一方、Ni NPs については、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できたが、10 mg/mL を懸濁原液の調製を検討する必要性を認めた。

3) ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

2 種類の ZnO NPs 分散製品について、懸濁液及び培地懸濁液中での物理化学的性質を明らかにした。また、THP-1 を用いた評価系を用いた細胞毒性、免疫応答解析では、A549 細胞を用いた先行実験の結果と比較すると、両細胞株ともに ZnO(Sigma)が強い細胞毒性を示し、IL-8 産生量、CD54 発現量も共に高い結果を得た。マテリアルの物理化学的性状の重要性を認めた。

4) ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

①Fe₃O₄ NPs 投与により、マウス肺に炎症

及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。

②変異頻度は RAW264 細胞の共存下で上昇することを認めた。変異スペクトル解析では、Fe₃O₄ NPs の各細胞単独の曝露時と比べ、両細胞曝露時に *in vivo* におけるパターンと類似することを認めた。これらのことから、*in vitro* 共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとしての有用である可能性が示された。

5) *in vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証：

再構成ヒト皮膚培養系の選定を行い、ナノ粒子の皮膚浸潤を病理組織学および ICP 測定を準備する段階とした。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティックスマーカーの検索：

カルボキシル基による修飾の有無が、miRNA の発現変動に最も大きな影響を与える因子であることがわかった。また、Fe₃O₄ NPs のカルボキシル基修飾の有無、暴露時間、および暴露濃度の 3 つの条件に基づく miRNA のクラスタリングから、特徴的な発現パターンを示す 4 つのクラスターを抽出した。これらの結果より、ナノマテリアルによる特徴的な miRNA 変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。

8) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

①A549細胞の細胞接着不良および十分な増殖が認められなかった原因は、担体の劣化が考えられ、次年度に新たに申請後に、新しい担体を作成する予定である。

②細胞の種類によりNPsの取り込まれる状況は異なり、またNPsの表面修飾によっても異なることを明らかにした。一方、取

り込まれたNPsのNFκB axisへの影響を認めた。

E. 結論

ナノマテリアルの毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。また、*in vitro*実験系での2次粒子径あるいはコロナの形成等も重要な因子である。本研究グループにおいて、培養液中などにおいて粒径分布、ゼータ電位の基礎的なデータを収集した。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規*in vitro*リスク評価系として、*in vivo* 実験 (gpt delta mouse)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功したAu NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、ナノマテリアルの皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation

in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.* in press.

- (2) M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015, 106(11), 1499-1505.
- (3) N. Hanagata, H. Morita, Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles, *J. Toxicol. Sci.*, 2015, 40(5), 625-35.
- (4) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R. A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe, Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.*, 2015, 10, 6105-19.
- (5) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88.
- (6) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichianagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia treatment. *J. Appl. Phys.*, 2015, 117, 17D157.

- (7) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 2015, 75 (10), 1009-19.
- (8) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.
- (9) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. *医学のあゆみ*, 2015, 252(4), 303-8.
2. 学会発表
- (1) 河上強志、宮島敦子、小森谷薫、加藤玲子、伊佐間和郎. NiO ナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第 24 回環境化学討論会, 札幌市, 2015 年 6 月.
- (2) 宮島敦子、河上強志、小森谷薫、加藤玲子、新見伸吾、伊佐間和郎. 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第 42 回日本毒性学会学術大会, 石川, 2015 年 6 月.
- (3) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016 (予定).
- (4) 戸塚ゆ加里、中釜斉: 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明. 第 42 回日本毒性学会学術大会、金沢、2015 年 7 月.
- (5) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会、福岡、2015 年 12 月.
- (7) 秋場望、椎崎一宏、遠藤治、三牧幸代、土原一哉、中釜斉、戸塚ゆ加里. 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第 44 回日本環境変異原学会、福岡、2015 年 12 月.
- (8) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (9) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (10) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三. 各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (11) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (12) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N.

Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(13) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(14) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects

of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果(見込み)概略図

H27年度

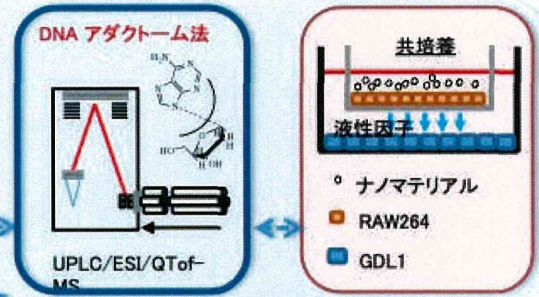
新規*In vitro*評価系の構築

ナノマテリアル供給・物理化学的性状解析

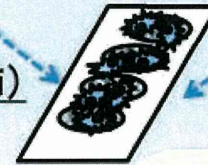
ナノマテリアル動態・毒性メカニズム解析

- ・DNA損傷性評価系の構築
 - アダクトーム
- ・生体を模倣した毒性試験
 - 共培養系
 - 切片培養系
 - 3D皮膚モデル
- ・生体評価影響に適したマーカーの探索

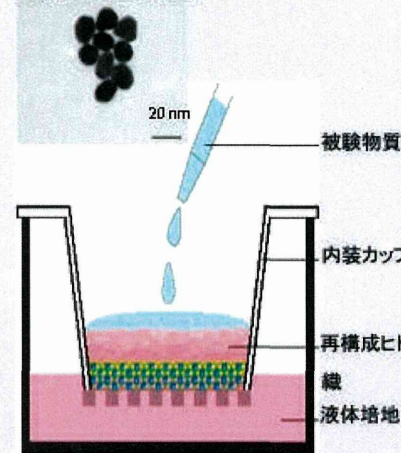
適切な*in vivo*動物実験による当該代替法の有効性の検証



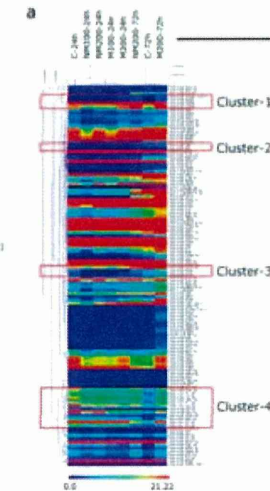
新規*in vitro*評価系(肺)



合成したAu NPs



新規*in vitro*評価系(皮膚)



miRNA網羅的解析

金ナノ粒子の合成、ナノマテリアルの2次粒子径の重要性、物理化学的性状と細胞毒性・免疫応答、表面修飾の細胞内取り込みとNFκB axisへの影響

II. 分担研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究
切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築
エピジェネティックスマーカーの検索
ナノマテリアルの細胞内動態の解析

研究代表者 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 工学研究院 教授

今年度は、ナノマテリアルの細胞内動態の解析について報告する。前立腺癌細胞株DU145に対して、 Fe_3O_4 NPsと Fe_3O_4 NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞膜上での状況を観察した。Alamar Blue assayを用いて、生存率を求めた。活性酸素種(ROS)の測定はCM-H₂DCFDAを使用した。Western blottingで、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHのDU145細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に低下し、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曝露時には有意に低下した。また、ROS産生は Fe_3O_4 NPsでは濃度依存的に増加、 Fe_3O_4 NPs-COOHは抑制されていた。AFMでは、 Fe_3O_4 NPs-COOHが細胞表面に付着する数は多く、粒子凝集体の粒径については、違いは認められなかった。胞内の生存シグナルであるNF κ Bの発現量は、 Fe_3O_4 NPsでは抑制され、 Fe_3O_4 NPs-COOHでは増強されるのを認めた。同一細胞に対して、磁性体ナノ粒子の修飾の有無による影響が確認できた。

A. 研究目的

本研究グループの目的は、ナノマテリアルの物性解析後、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびジェネティクスおよびエピジェネティクスな変化を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。本研究での分担は、(1) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築、(2) エピジェネティックスマーカーの検索、(3) ナノマテリアルの細胞内動態の解析

である。(1)に関して、過去の切片担体培養の条件で、A549細胞の試行培養を行った。既に作成された凍結切片を用いて(本学動物実験取扱い委員会に過去提出済み)、担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、各臓器のスライドガラスを準備し、細胞を播種し、接着性と増殖性を解析した。A549細胞の担体培養を行ったが、総じて細胞接着が悪く、その後の十分な増殖も認められなかった。従って、(3)について、報告をまとめた。前立腺癌細胞株 DU145 に対して、 Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 NPs-COOH を各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)、

カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs-COOH)の細胞膜上の状態を観察した。また、Alamar Blue assay を用いて、生存率を求めた。活性酸素種 (ROS) の測定は CM- H_2DCFDA を使用した。また、Western blotting で、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。

B. 研究方法

1) 使用細胞株と細胞培養

本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 を使用した。同細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。DU145 は RPMI 1640 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)を用いて 37 °C、 CO_2 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した磁性体ナノ粒子 (Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOH)

磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe_3O_4 (マグネタイト)で構成されている。 Fe_3O_4 は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ へ成分に変化があるがどちらの場合も磁性を示す酸化物である。

非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は戸田工業株式会社より購入し、また、表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs-COOH)は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。各々 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養液に調整して、超音波破砕機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社)にて、分散処理を行い、 Fe_3O_4 NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe_3O_4 NPs 曝露前には、培養液中における Fe_3O_4 NPs の大きさ、粒径の分布を濃厚系粒径アナライザー (Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000、大塚電子)にて測定を行った。

3) Cell viability の測定

生細胞の細胞数の変化を測定するために本実験においては Alamar Blue (Alamar Bioscience, Sacramento, California, USA)を用いた。細胞は細胞密度が 1.0×10^4 cells/well となるように 24 well プレートに再播種、培養した。 Fe_3O_4 NPs 曝露後に、培養液を取り除き、PBS を用いて細胞上に付着した Fe_3O_4 NPs をウォッシュアウトする。そして、培養液で 10 倍希釈した Alamar Blue 溶液を 500 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加した。37 °C、5 % CO_2 加湿インキュベーター内で 3 時間培養後、細胞内や細胞に付着した NPs の影響を考慮し、Alamar Blue 溶液の上澄みを 450 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ別の 24 well plate に移し替えた。その後、分光光度計(Viento XS、DS Pharma Biomedical Co., Ltd)により 570 nm と 600 nm の波長を測定し、生存率を求めた。

4) 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の測定

5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate , acetyl ester CM- H_2DCFDA (Invitrogen 社)を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った。6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well になるように播種した。まず、PBS 8.54 ml に CM- H_2DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1ml に 10 μM に調整した試薬を 200 μl 加えた。その後 30 分インキュベーターを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、Imaging Soft (Photoshop Elements 8 ;Adobe)を用いて、画像の輝度と細胞の接着の面積(Pixel 数)を求めて、定量化を行った。

6) AFM による DU145 細胞上の NPs 観察

以下の工程でゼラチンコートを作成した。ゼラチン粉末+純水で 1 mg/ml (0.1%)のゼラチン溶液を作製し、オートクレーブで 120 °C、10 分で溶解させた。35 mm dish に

ガラス基板を入れて3 mlゼラチン溶液を入れて60分静置し、最終的にゼラチン溶液を除去し、クリーンベンチUV下で乾燥させた。AFM観察用に細胞を培養するためガラス基板にゼラチンをコートした。ゼラチンコート済のガラス基板に細胞を播種した。播種24時間後、細胞をカバーガラス上に接着させたまま固定(グルタルアルデヒド)した。固定した細胞をAFM装置(プローブステーションSPI3800N(NanoNavi II Station)、SIIナノテクノロジー社;顕微鏡ユニット:SPA-400、SIIナノテクノロジー社)で測定し、写真撮影を行った。

7) NF- κ B の発現量の測定

細胞密度が 2.0×10^5 cells/well(24時間曝露)、 0.8×10^5 cells/well(72時間曝露)となるように細胞を6 well plateに播種した。細胞接着後、 Fe_3O_4 NPsあるいは Fe_3O_4 NPs-COOH曝露を行った。一定時間後、PBSを用いてNPsをウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 250 μ lを添加して細胞を剥離し、回収した。回収した全ての細胞を1000 rpm、5分の条件で遠心分離し上清を除去した後、PBSに懸濁した。15000 \times g、3分の条件で遠心分離し、細胞をペレット状にした後上清を除去した。RIPA buffer 30 μ l/sampleにprotease inhibitor, phosphatase inhibitorを0.3 μ l/sampleずつ混ぜMixを作り、各サンプルに30 μ lずつ添加したあとホモジナイズした。4 $^\circ$ C、15000 \times g、30分の条件で遠心分離し、その上清をWB sampleとした。

Sampleのタンパク質濃度をBradford法によって測定し、全量10 μ l、タンパク質量が10 μ gとなるようにsampleとPBSを混合した。そこに同量の2 \times SDS sample buffer(10%メルカプトエタノール含有)を加え計20 μ lとし、95 $^\circ$ C、5分の条件でタンパク質を変性させた。

その後、E SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel electrophoresis)を

行い、タンパク質を分離した。電気泳動を行ったゲルからPVDF membraneに分離したタンパク質を転写し、吸着させた。転写後、membraneをTBS-T buffer(2% BSA含有)に1時間振盪させ、ブロッキングを行った。

ブロッキング後、Signal Boosterを用いて、一次抗体である β -actin抗体(abcam)を5000倍希釈、NF- κ B抗体を1000倍希釈し、membraneを浸透させ、4 $^\circ$ Cで一昼夜処理した。その後、TBS-T bufferにmembraneを10分振盪し、洗浄した。この操作を3回繰り返した。

それぞれの抗体の動物種由来に対応するHRP標識二次抗体をSignal Boosterを用いて10000倍に希釈し、membraneを室温で1時間振盪した。その後、TBS-T bufferにmembraneを10分振盪させ、洗浄した。この操作を3回繰り返した。洗浄後、発光試薬をmembraneの表面に垂らし、5分ほど反応させ、検出器を用いて化学発光を検出し、バンドの検出を行った。各Sampleのバンドの定量化はImage Jを用いて行った。

なお、抗癌剤docetaxel(DTX)は前立腺癌細胞でNF- κ Bの発現を誘導する事が知られているので、positive controlとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行う。

C. 研究結果

1) 細胞生存率

前立腺癌細胞株DU145において(図1)、 Fe_3O_4 NPsおよび Fe_3O_4 NPs-COOHの曝露量

が増えるに従い、ともに細胞生存率は低下し、200 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時には有意に低下した ($p < 0.05$)。しかし、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露時に比べ、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 曝露時は細胞生存率の低下は抑制されるも両者の間に有意差は認めなかった。

2) ROS 生成の測定

DU145 細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を図 2 に示す。ROS の産生量を、Control 時を 1.00 [-]として数値化を行った。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露では、100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時より有意に ROS 産生が確認された ($p < 0.05$)。一方、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 曝露では、濃度に関係なく変化を認めなかった。

3) DU145 細胞上の NPs 観察

図 3 は NPs を曝露していない時の DU145 細胞の AFM 像を示した。図 4 および図 5 はそれぞれ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を添加した場合の DU145 細胞を示している。観察範囲について比較すると、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ に比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。細胞表面に付着している NPs 凝集体の粒径については、表面修飾の有無による違いは認められなかった。

5) NF- κ B の発現量の測定

Control 時 1.00 [-]、DTX 1 nM 処理時 1.89 [-]、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 1.65 [-]、DTX 1 nM と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 1.29 [-]、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 0.86 [-]、DTX 1 nM と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 0.80 [-]であった (図 6)。

D. まとめ

同一細胞に対する非修飾・カルボキシル基修飾の磁性体ナノ粒子の影響を調べた。カルボキシル基修飾により、非修飾と比較して有意差を認められなかったが、細胞生存率の減少を抑制することが出来た。また、ROS 産生も抑制することが確認出来た。一方、非修飾磁性体ナノ粒子とカルボキシル

基修飾磁性体ナノ粒子の細胞への影響で、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響に差を認めた。加えて、細胞膜表面上の磁性体ナノ粒子の観察で、その分布状態に差を認めたが、これの細胞毒性への影響については更なる解析が必要と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88.
- (2) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichiyanagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles for hypertension treatment. *J. Appl. Phys.*, 2015, 117, 17D157.
- (3) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 2015, 75(10), 1009-19.
- (4) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.

(5) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. 医学のあゆみ, 2015, 252(4), 303-8.

2. 学会発表

(1) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.

(2) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.

(3) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三.各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について.第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.

(4) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

(5) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N. Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

(6) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

(7) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし