

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- H_2 DCFDA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、およびエピ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 $-\text{Fe}_2\text{O}_3$ 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、超音波破碎機 (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 , Sacrament、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、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 α -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 1nM 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 1nM 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. Ichiyangi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn $_{1-x}$ Zn $_x$ Fe $_2$ 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

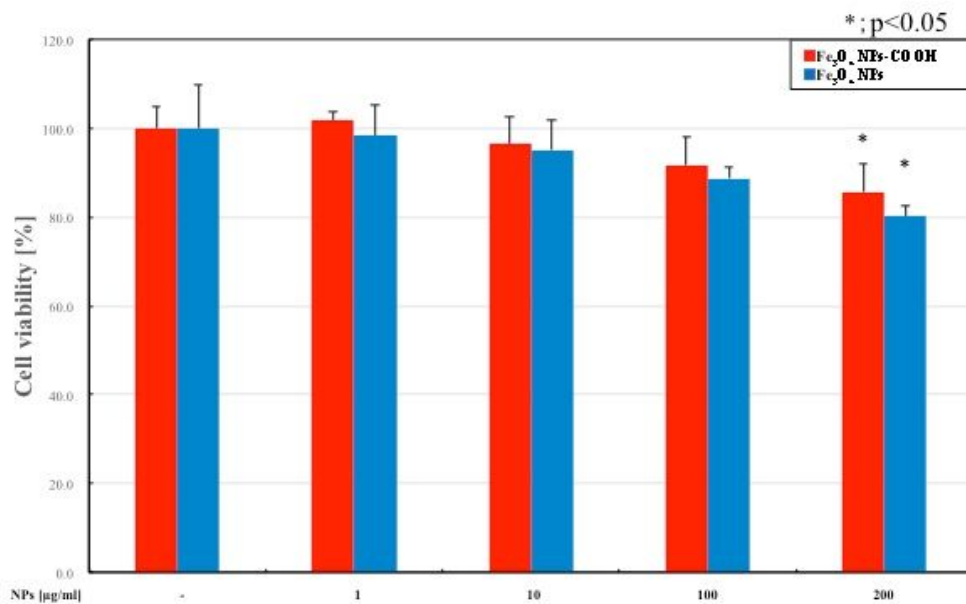


図 1. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の生存率

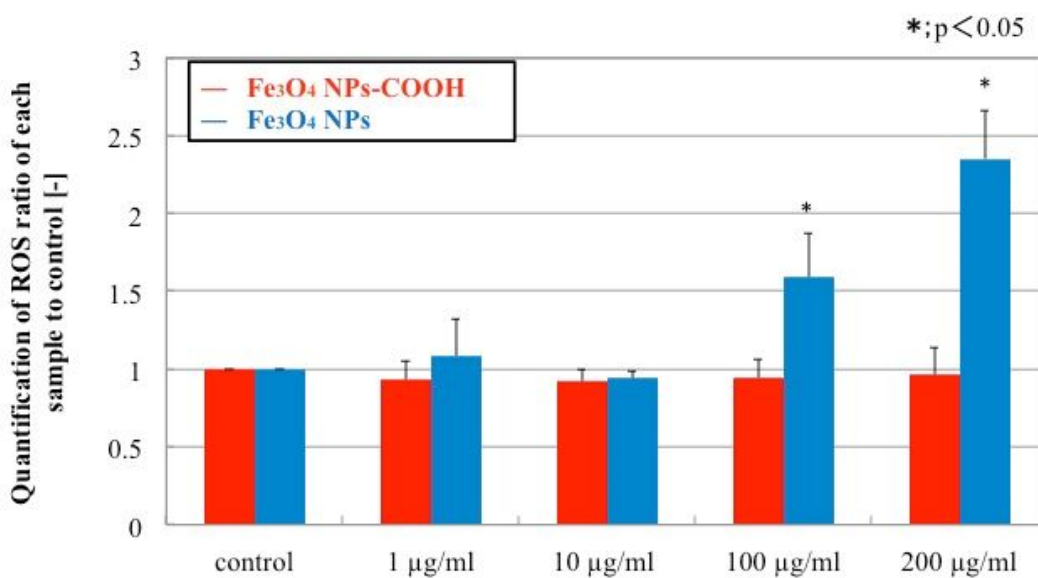


図 2. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の ROS 生成

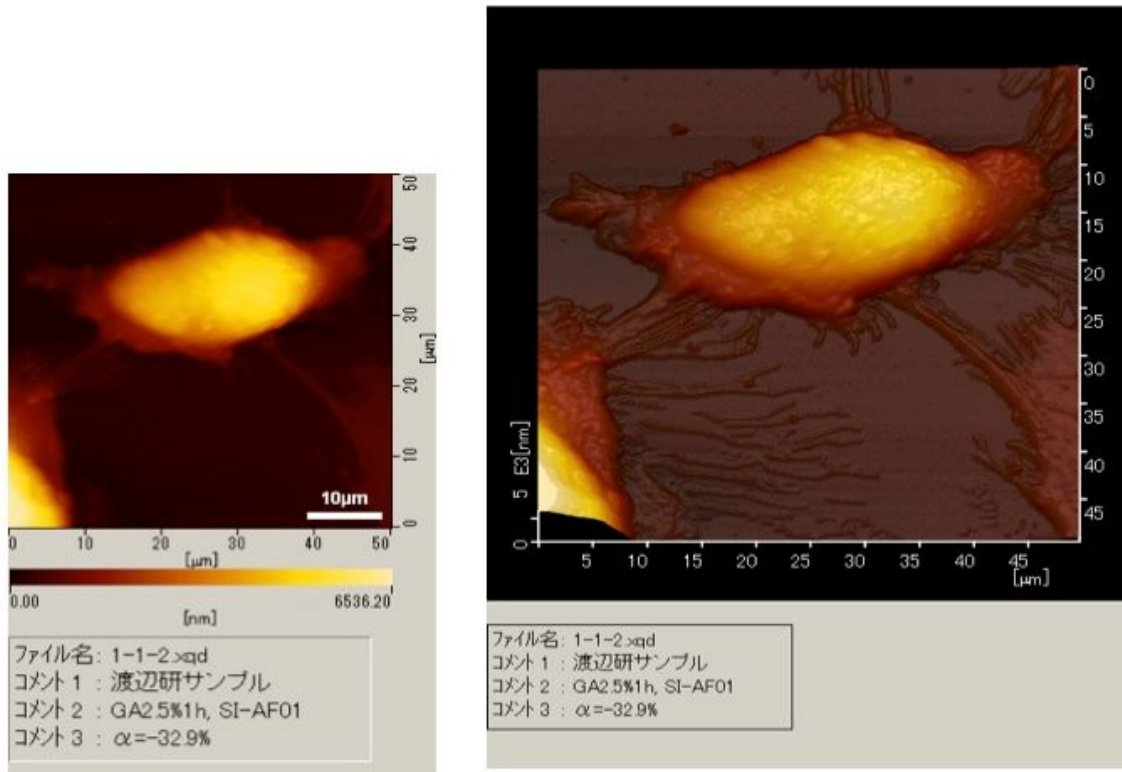


図 3. AFM によるナノ粒子を曝露していない DU145 細胞像

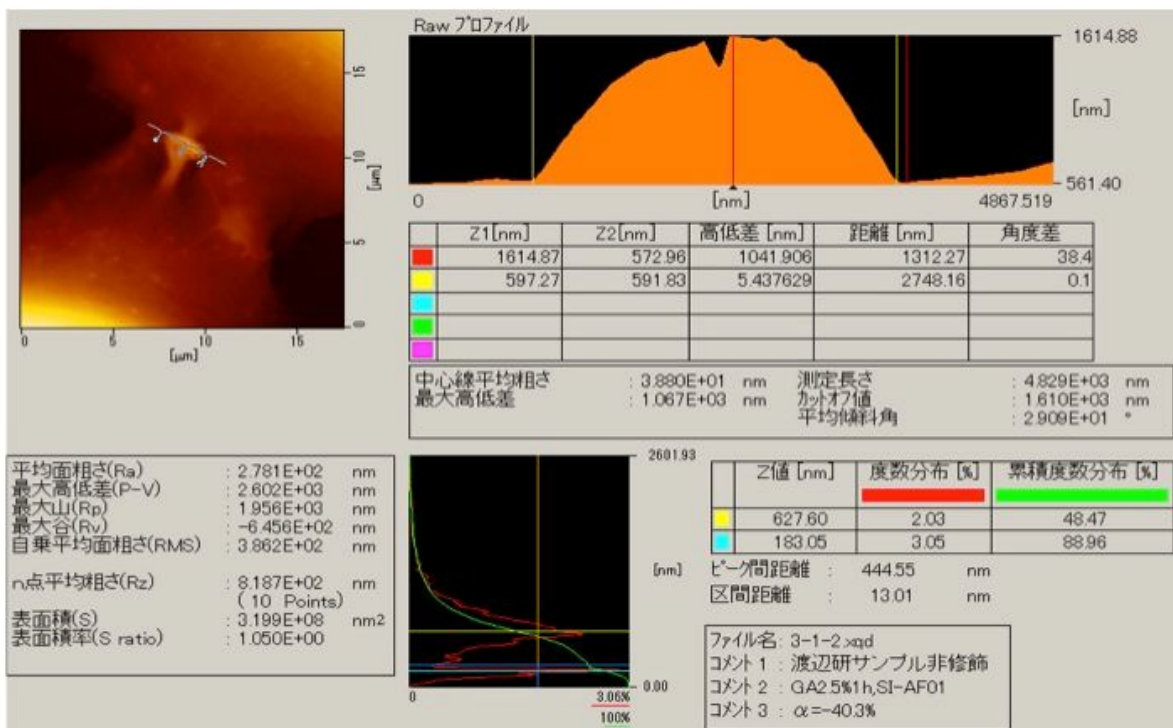


図 4. AFM による Fe₃O₄ NPs を曝露した DU145 細胞像

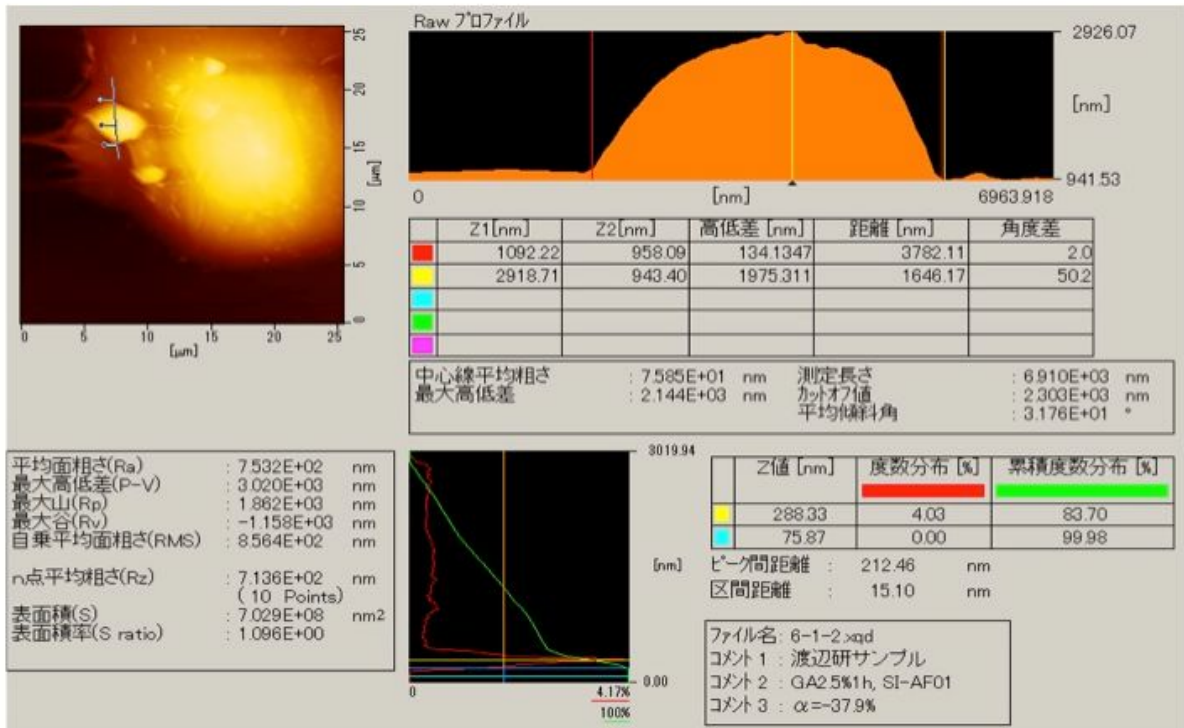


図 5. AFM による Fe₃O₄ NPs-COOH を曝露した DU145 細胞像

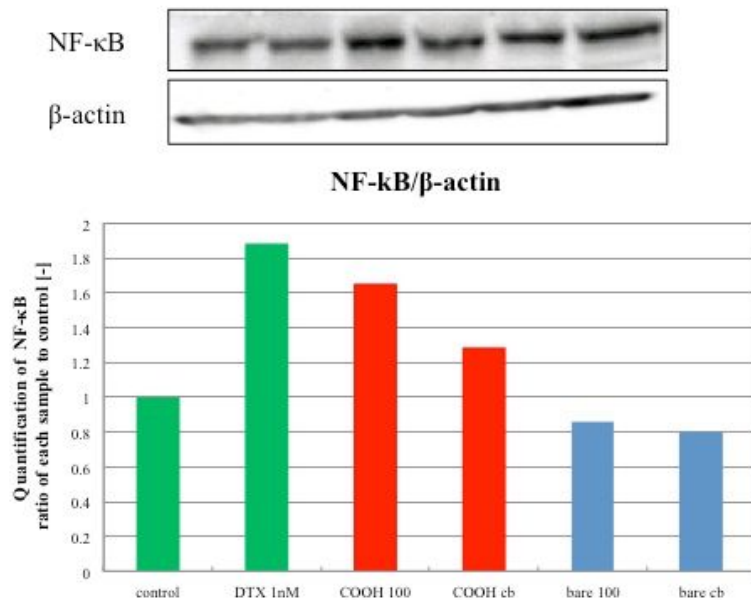


図 6. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の NF-κB 発現量