

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  
ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析

研究分担者 花方 信孝 国立研究開発法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長

本研究は、非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子の肺上皮細胞A549への曝露実験で、網羅的miRNA発現解析を行い、そのクラスタリング解析から、ナノマテリアルにより変動する特徴的なmiRNA群を認めた。特に、曝露72時間において、磁性粒子の修飾の有無はmiRNAの発現に大きな影響を及ぼすことがわかった。これらのmiRNAは、曝露マーカーとしての可能性に加え、磁性ナノ粒子による肺上皮細胞の分子応答解析のための手がかりになると考えられる。

#### A. 研究目的

ナノマテリアル曝露の*in vitro*における影響に関しては、細胞の生死あるいは細胞内の特定酵素の活性が細胞毒性の指標となっている。しかしながら、ナノマテリアル曝露に細胞毒性が観察された場合、その毒性がどのような細胞機能に影響するのか、その分子機構に関する詳細な解析は行われていない。たとえば、ナノマテリアルが細胞内で活性酸素を発生させ、その活性酸素が細胞毒性を誘導するという報告は多いが、活性酸素が細胞機能にどのような影響を及ぼし、どのように生理状態が変化するのかに関しては詳しくわかっていない。

本研究では、近年、様々な遺伝子の制御因子として注目されているmicroRNA(miRNA)が、ナノマテリアルに曝露された細胞でどのように変化するのかを解析することによって、ナノマテリアル曝露のマーカーとしてのmiRNAを探索するとともに、同定されたmiRNAが制御する遺伝子を探索し、ナノマテリアルの細胞毒性に関する分子応答機構についての情報を得ることを目的とする。

#### B. 研究方法

非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ )を A549 細胞に 24 時間あるいは 72 時間曝露し、RNA を回収した後、Agilent G4870A SurePrint G3 Human v16 miRNA 8x60K Microarray Kit にて miRNA の発現を解析した。アレイ上の各スポットの蛍光強度は Agilent G2600D SureScan Microarray Scanner により計測し、Agilent Feature Extraction v11.5 によって数値化した。

なお、それぞれの曝露サンプルは、以下のようにサンプル名を付した。

C-24h : NPs で曝露せずに 24 時間培養した細胞

NM100-24h : 修飾していない (non-modified) NPs を 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 24 時間曝露した細胞

NM200-24h : 修飾していない (non-modified) NPs を 200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 24 時間曝露した細胞

M100-24h : 修飾した (modified) NPs を 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 24 時間曝露した細胞

M200-24h : 修飾した (modified) NPs を

200 µg/ml の濃度で 24 時間曝露した細胞  
C-72h : NPs で曝露せずに 72 時間培養した細胞

NM200-72h : 修飾していない (non-modified) NPs を 200 µg/ml の濃度で 72 時間曝露した細胞  
M200-72h : 修飾した (modified) NPs を 200 µg/ml の濃度で 72 時間曝露した細胞

### C. 研究結果

miRNA マイクロアレイから得られたデータにおいて、シグナルが検出されなかった miRNA は発現していないと仮定して、シグナル強度を 0 とした。シグナル強度はサンプル間の誤差が含まれている可能性があるため、グローバルノーマライゼーションにより各サンプルのシグナル強度を補正した。

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 (図 1a, b)。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。ひとつは C-24h、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなり、もう一方は NM200-72h、C-72h、M200-72h からなっていた (図 1b)。すなわち、前者は、NPs の曝露の有無にかかわらず培養後 24 時間経過した細胞のグループであり、後者は NPs の有無にかかわらず培養後 72 時間経過した細胞のグループである。これは、118 個の miRNA の発現パターンに最も大きな影響を与えている因子が、NPs ではなく培養時間であることを意味している。24 時間培養した細胞グループにおいては、C-24h が単独でグループを形成し、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなるグループとは分離している。これは、培養 24 時間後において、

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を示している。さらに、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなるグループは、NM100-24h と NM200-24h からなるグループと M100-24h、M200-24h からなるグループに分かれている。このことから非修飾 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が、これらの NPs の濃度の違いは miRNA の発現パターンに大きな影響を及ぼさないことが推測された。一方、72 時間培養したグループにおいては、C-72h と M200-72h がグループを形成し、NM200-72h とは分離していた。これは、培養後 72 時間において、修飾 NPs に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは NPs に曝露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾 NPs に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは NPs に曝露されていない細胞とは異なることを意味している。

次に、特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した (図 1a)。Cluster-1 は、has-miR-1274\_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している (図 2, 表 1)。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている (図 2, 表 2)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている (図 2, 表 3)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞

で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時間暴露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった (図 2, 表 4)。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

#### D. 考察

クラスタリングの結果、曝露細胞の miRNA の変動は、72 時間の曝露においてカルボキシル基による修飾の有無に影響されることが明らかとなり、この修飾が細胞毒性の大きさと関連することが示唆された。本研究で得られた miRNA 群が、どのような遺伝子の発現を制御しているのかを見出すことができれば、磁性ナノ粒子によって影響を受ける分子応答についての情報を得ることができると考えられる。今後は、カルボキシル基の修飾の有無と細胞毒性により影響を受ける miRNA の絞り込みを行い、マーカーとなる miRNA の選択を試みる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 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



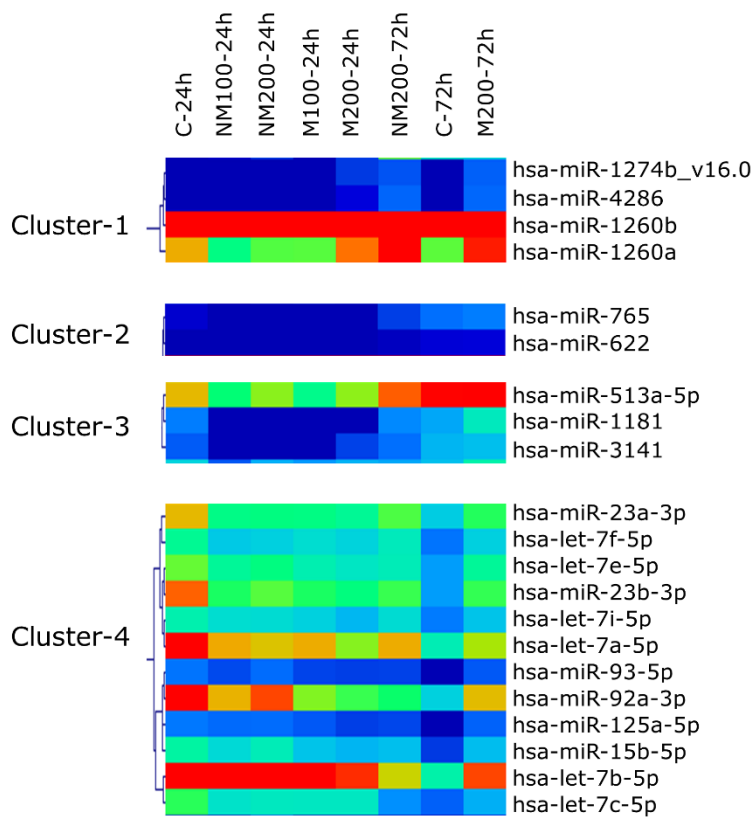


図 2 . それぞれのクラスターのヒートマップとクラスターを構成する miRNA

**表 1** Cluster-1 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-1274b_v16.0	ND	ND	ND	ND	2.4	ND	3.3	3.7
hsa-miR-4286	ND	ND	ND	ND	2.2	ND	3.9	4.0
hsa-miR-1260b	31.3	24.9	33.2	30.5	42.8	31.7	57.1	51.8
hsa-miR-1260a	17.1	11.7	13.6	13.7	18.5	13.7	21.2	20.3

ND, not detected

**表 2** Cluster-2 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-765	1.8	ND	ND	ND	ND	4.2	2.6	4.7
hsa-miR-622	ND	ND	ND	ND	ND	2.1	1.4	2.1

ND, not detected

**表 3** Cluster-3 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-513a-5p	16.7	12.1	14.6	11.4	14.7	20.7	18.9	26.9
hsa-miR-1181	4.7	ND	ND	ND	ND	6.3	5.1	9.7
hsa-miR-3141	3.5	ND	ND	ND	2.7	6.8	4.2	7.3

**表 4** Cluster-4 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100-24h	NM200-24h	M100-24h	M200-24h	C-72h	NM200-72h	M200-72h
hsa-miR-23a-3p	16.7	11.6	11.8	11.7	11.1	8.0	13.5	12.9
hsa-let-7f-5p	11.2	7.8	8.1	8.9	8.3	4.4	9.8	8.2
hsa-let-7e-5p	13.9	11.1	11.7	10.2	9.4	5.9	9.9	11.0
hsa-miR-23b-3p	18.8	12.7	13.7	12.7	11.9	5.8	13.2	13.1
hsa-let-7i-5p	10.2	8.8	8.7	8.2	7.0	4.6	8.8	7.5
hsa-let-7a-5p	21.8	17.2	16.5	17.1	14.5	10.0	17.1	15.2
hsa-miR-93-5p	4.4	3.0	4.1	2.7	2.6	ND	2.7	3.4
hsa-miR-92a-3p	21.2	16.9	19.4	14.4	13.2	8.2	12.5	16.7
hsa-miR-125a-5p	4.6	4.1	4.1	3.5	2.7	ND	2.8	3.8
hsa-miR-15b-5p	10.7	8.6	9.9	7.5	6.9	2.4	7.3	7.2
hsa-let-7b-5p	28.0	21.9	21.0	21.8	19.9	10.4	16.0	19.5
hsa-let-7c-5p	12.9	9.2	9.6	9.5	9.5	3.7	5.4	6.6

ND, not detected