

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および機能解析

今年度は、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および機能解析について報告する。A549細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種(ROS)の発生及び細胞生存率の変化を認めた。前立腺癌細胞株DU145、LNCaP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、透過型電子顕微鏡にて局在を観察した。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。また、細胞内のGSHの測定を行った。細胞株に関わらず、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの局在が異なることが認められた。 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの曝露により、両細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に有意差をもって低下した。また、細胞内ROS産生およびGSH量の結果より、DU145およびLNCaPは Fe_3O_4 NPsによるROS-dependentな反応を示し、 Fe_3O_4 NPs-COOHによるROS-independentな反応を示し、また、細胞間の差異を認めた。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るも、細胞の種類も重要な因子である事を確認した。

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

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、新たに作成された凍結切片を用いて、A549細胞の切片担体培養を行

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)に関して、花方分担研究者との共同研究のためにここでは省略させていただいた。(3)について、前立腺癌細胞株 DU145 および LNCaP に対して、非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)とカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(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、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞内の局在を観察した。また、Alamar Blue assayを用いた生存率、

CM-H₂DCFDA による活性酸素種 (ROS) の測定、細胞内 GSH の測定を行った。

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依存性前立腺癌細胞株 LNCaP、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 およびヒト肺上皮細胞由来 A549 を使用した。これら細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。LNCaP および DU145 は RPMI 1640 培養液 (10 % FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有) を用いて、また A549 は F12 培養液を用いて 37 °C、CO₂ 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 (Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄ (マグネタイト) で構成されている。Fe₃O₄ は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は -Fe₂O₃ 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 (Fe₃O₄ 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 (Fe₃O₄ NPs-COOH) は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。各々 1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/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、Fe₃O₄ NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe₃O₄ NPs 曝露前には、培養液中における Fe₃O₄ 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) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察 所定の条件で各細胞に Fe₃O₄ NPs と Fe₃O₄ NPs-

COOH を 24 時間曝露後、回収し、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、外部に切片の作成および TEM の撮影の委託した (花市電子顕微鏡技術研究所)。

4) 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。Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄ 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 μl/well ずつ添加した。37 °C、5 % CO₂ 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 μl/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。

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

5- (and 6) -chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate、acetyl ester CM-H₂DCFDA (Invitrogen) を用いて、活性酸素種 (ROS) の測定を行った。6 well プレートに細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well になるように播種した。まず、PBS 8.54 mL に CM-H₂DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well プレートの培地を吸引して、その well に PBS 1 mL 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) 細胞内 GSH の測定

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が 1.0×10^4 [cells/well] となるように 24 well プレートに播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露を行った。

曝露 24 時間後に培養液を除去した後、試薬を添加した。1×GSH-Glo™ 試薬 (Promega, Madison, WI) を 100 μ L/well 加えた。試薬の内訳は Luciferin-NT 1 μ L, Glutathione S-Transferase 1 μ L, GSH-Glo™ Reaction 100 μ L である。プレートシェイカーに乗せて 30 min, 室温でインキュベートし、先ほどの 1×GSH-Glo™ 試薬を除去、Luciferon Detection 試薬を 100 μ L/well 加えた。試薬の内訳は Luciferin Detection Reagent, Reconstitution Buffer with esterase である。その後プレートシェイカーに乗せて 15 min, 室温でインキュベート、プレートリーダーでの発光のプログラムで測定した。

データの算出方法は、以下の通りに行った。まず、Control の値の平均をとり、各々のサンプル値を Control の平均値で割った。各々のサンプルごとに出した値の平均、標準偏差を算出した。

7) 切片担体の作成 ラット (SD, male, 21 weeks) 2 匹を安楽死後に、臓器を摘出し、OCT コンパウンドに包埋し、-80 で保存した。凍結した組織をクライオスタットで切片を作成し、アセトン固定あるいは風乾し-80 で保存した。

8) 切片担体培養 組織切片担体を 4 well multidish (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) に入れ、4 で乾燥させた後に培養液を入れ、A549 細胞を 7×10^4 cells/well 播種、培養をした。24 時間毎に細胞形態の観察および細胞接着数 [cells/cm²] を計測した。

9) 切片担体培養系による A549 細胞の毒性評価 A549 細胞の組織切片担体培養に磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露し、Alamar Blue を用いて、細胞生存率を測定した。また、

組織切片担体上の A549 細胞の ROS 産生を Flowcytometry により測定を行った。

(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* 実験が主体であるが、ラットより組織切片担体を得るために本学動物実験取扱い委員会に審査を受けている。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。

C. 研究結果

1) 前立腺癌細胞における Fe₃O₄NPs と Fe₃O₄NPs-COOH の細胞内の局在 細胞の種類に問わず、Fe₃O₄NPs はミトコンドリアあるいは細胞質に存在するのを認めた。一方、Fe₃O₄NPs-COOH はライソゾームと思われる構造物に集積するのを認めた。

2) 細胞生存率

曝露 72 時間後の前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 の細胞生存率の結果を示す (図 1)。LNCaP に関して、非曝露群と比べて Fe₃O₄NPs 100 μ g/mL、200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。また、Fe₃O₄NPs-COOH 100 μ g/mL 曝露群では $p < 0.01$ 、200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。DU145 に関して、非曝露群と比べて Fe₃O₄NPs 200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。また、Fe₃O₄NPs-COOH 200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

3) ROS 生成の測定

24 時間曝露後の細胞内 ROS 生成量を定量化した解析結果を示す (図 2)。各データは非曝露群を 1.00 [-] として数値化を行った。LNCaP に Fe₃O₄NPs の 24 時間曝露時にお

いて、非曝露群 1.00 ± 0.003 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.02 ± 0.13 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.96 ± 0.10 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.04 ± 0.20 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.13 ± 0.17 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の 24 時間曝露時において、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.61 ± 0.12 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.69 ± 0.12 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.78 ± 0.07 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.81 ± 0.05 [-]であった。

DU-145 に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の 24 時間曝露時において、非曝露群 1.00 ± 0.15 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.01 ± 0.03 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.89 ± 0.08 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.51 ± 0.06 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 2.18 ± 0.08 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の 24 時間曝露時、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.91 ± 0.25 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.03 ± 0.24 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.94 ± 0.24 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.01 ± 0.27 [-]であった。非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群では、 $p < 0.05$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群では、 $p < 0.01$ の有意差での低下が認められた。

4) 細胞内の GSH 量の測定

細胞内 GSH を定量化した解析結果を図 3 に示す。データは control 時を 1.00 [-]として数値化を行った。

LNCaP に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を曝露した場合、非曝露群 1.00 ± 0.41 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.16 ± 0.25 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.18 ± 0.24 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.00 ± 0.23 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.94 ± 0.20 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を曝露した場合、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.93 ± 0.14 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.93 ± 0.19 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.85 ± 0.13 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露した時 0.79 ± 0.15 [-]であった。

DU-145 細胞に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を曝露した場合、非曝露群 1.00 ± 0.03 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.04 ± 0.009 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.19 ± 0.01 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.81 ± 0.062 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.75 ± 0.08 [-]であった。

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を曝露した場合、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.18 ± 0.05 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.17 ± 0.002 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.11 ± 0.013 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.06 ± 0.01 [-]であった。

5) A549 細胞の切片担体培養系による毒性評価

肝および肺組織切片担体培養における A549 の細胞密度の経時変化を示す (図 4、5)。これらの結果より、肝あるいは肺組織切片担体培養において、アセトン固定かつ切片の厚さが $4 \mu\text{m}$ で実験を行う事に決定した。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露時の各組織切片担体上の A549 細胞の生存率を、Alamar Blue 吸光度から直接算出したものと、検量線から算出したものの 2 種類をまとめた結果を図 6 に示す。

吸光度の測定値から直接算出した生存率は、スライド上非曝露群が 100.0 ± 2.96 %、スライド上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 105.5 ± 4.11 %、肺切片担体上非曝露群が 97.0 ± 3.57 %、肺切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 104.5 ± 5.28 %、肝臓切片上非曝露群が 90.7 ± 1.60 %、肝臓切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 99.7 ± 2.54 %であった。いずれも統計学的に有意差を示す減少は認められなかった。

検量線から算出した生存率は、スライド上非曝露群が 100.0 %、スライド上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 100.7 %、肺切片担体上非曝露群が 101.1 %、肺切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 100.9 %、肝臓切片上非曝露群が 96.5 %、肝臓切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 96.8 %であった。

組織切片担体上で培養した細胞を回収し、Flow cytometry によって細胞内 ROS 産生量を定量的に測定した結果を図 7 に示す。スライドガラス上では曝露群 100 ± 20.2 %、 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 125.0 ± 51.1 %、肺切片担体上では非曝露群時 100

± 39.6 %、100 µg/mL 曝露群 122.3 ± 22.1 %、肝臓切片担体上では非曝露群 100 ± 12.9 %、100 µg/mL 曝露群 114.1 ± 33.0 %であった。いずれも統計学的に有意差を示す上昇は認められなかった。

D. まとめ

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種 (ROS) の発生及び細胞生存率の変化を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。この培養系の評価は、GDL-1 細胞を使用した変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。また、活性酸素種に対する応答が異なる 2 つの前立腺癌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。修飾により、ナノ粒子の細胞内局在が異なり、ROS-dependent/independent の反応が生じることが明らかにされた。一方、その反応の程度は、細胞種により異なる可能性が示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Tone, S. Yoshioka, H. Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, M. Watanabe, A. Umezawa. Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform. *BioMed research International*. 2016, 2016, 7098987.
- (2) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effects of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes*

Environ. 2017, 39, 12.

- (3) 渡邊昌俊, 菅野純. 特集ナノトキシコロジー「はじめに」. *医学のあゆみ*. 2016, 259(3) 215.
- (4) 小島佳奈子, 斉藤春五, 渡邊昌俊. ナノトキシコロジーにおける in vitro 評価試験：現状と将来. *医学のあゆみ*. 2016, 259(3), 255-260.

2. 学会発表

- (1) K. Kojima, S. Hashimoto, R. Sakamaki, S. Takahashi, R. Kasakura, R. Maruyama, H. Ishiguro, H. Uemura, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles enhance anti-tumor effect of docetaxel on prostate cancer cells via ROS generation and NF-kappa B signaling. April 16-20, 2016, New Orleans, LA.
- (2) S. Hashimoto, K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, T. Nittami, M. Watanabe. Cytotoxicity of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄: cell vision versus surface modification. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (3) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. Iron oxide nanoparticles enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B and anti-apoptotic pathway in prostate cancer cells. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (4) S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of A549 cells after iron oxide nanoparticles exposure. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, K. Yamamoto, S. Ota, Y. Takemura, M. Watanabe. Effect of

carboxylated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *via* NFκB-independent pathways. International Workshop on Magnetic Bio-Sensing 2016, Oct.12-14, 2016, Fukuoka.

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

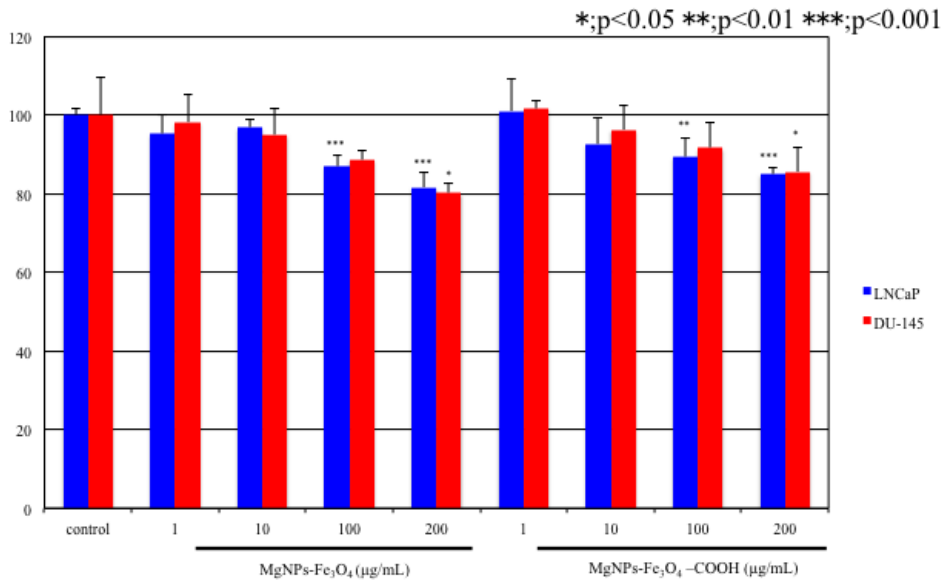


図 1. Fe₃O₄NPs と Fe₃O₄NPs-COOH 曝露時の DU145、LNCaP 細胞の生存率

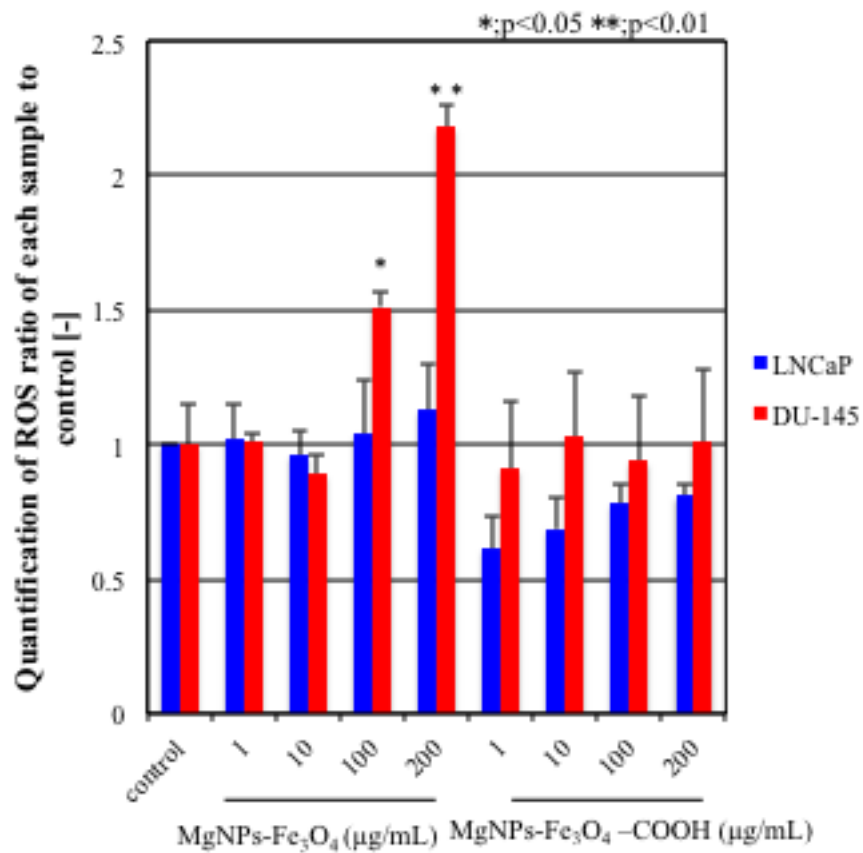


図 2. DU145 および LNCaP 細胞における ROS 産生

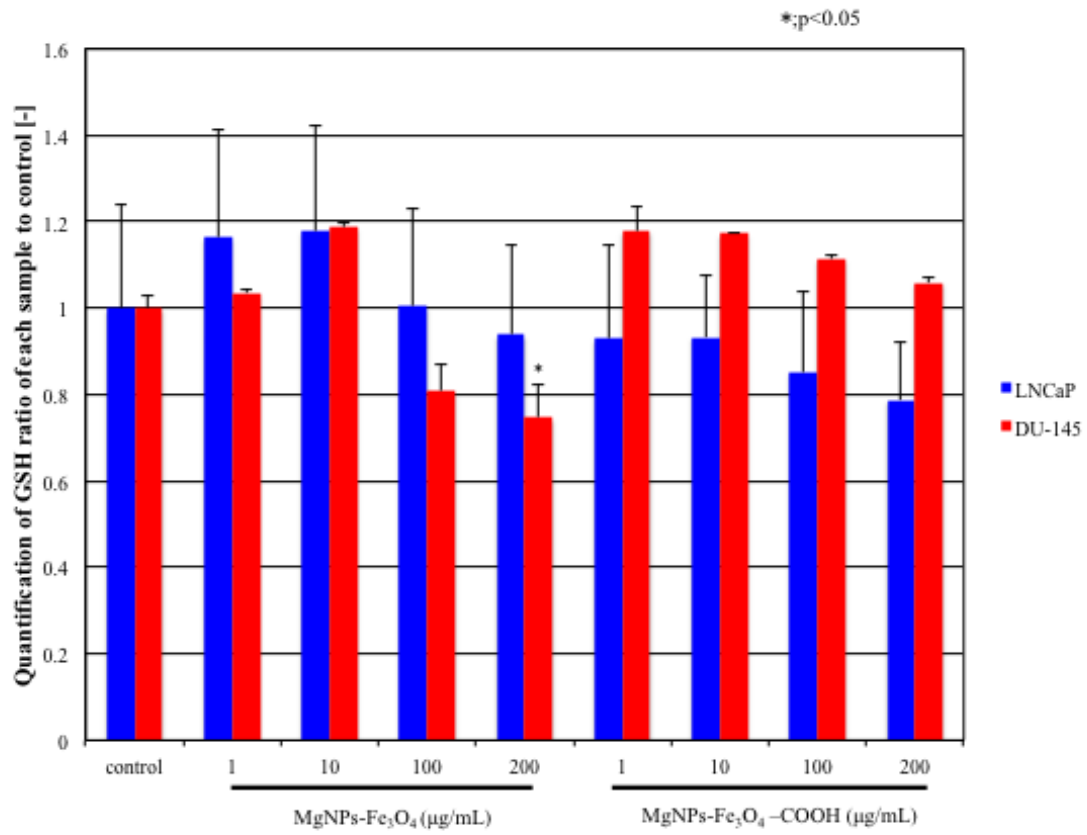


図 3. 細胞内の GSH 量の測定

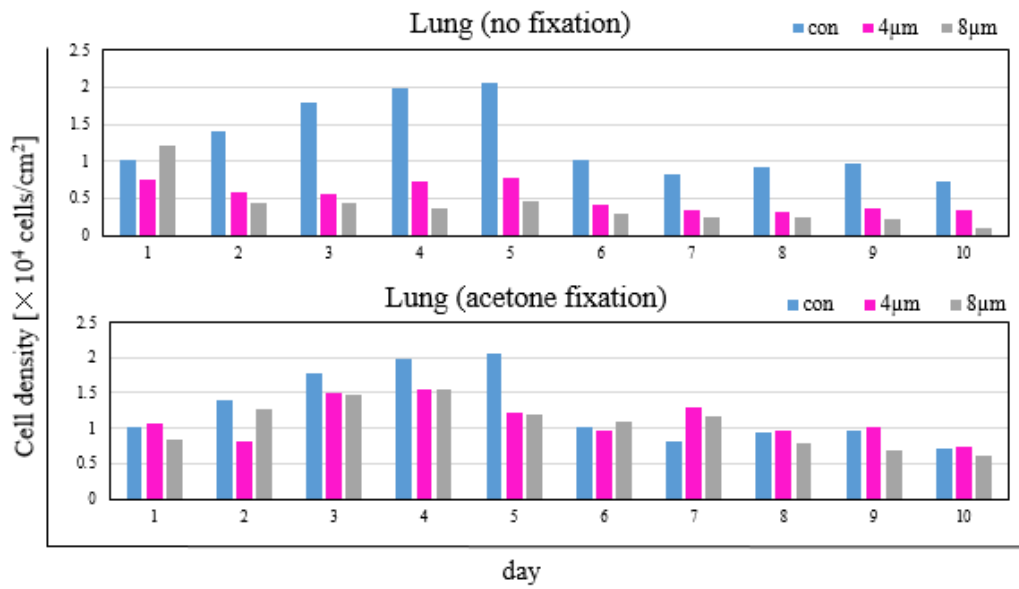


図 4. 肺組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

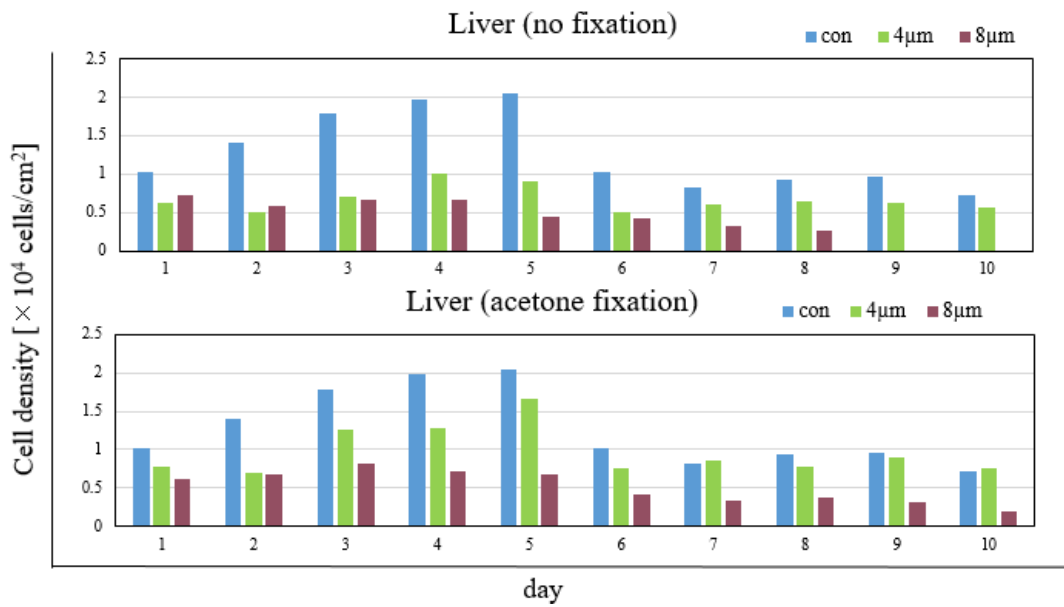


図 5. 肝組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

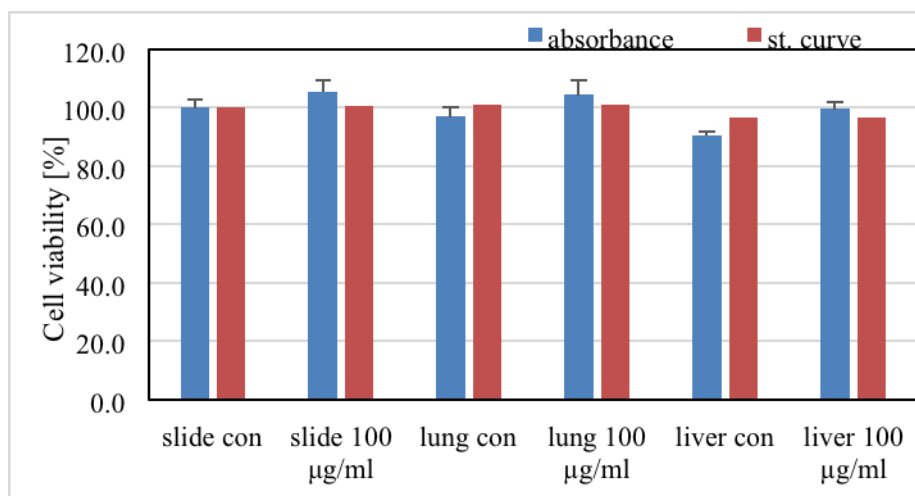


図 6. ナノ粒子曝露による切片担体培養における細胞生存率

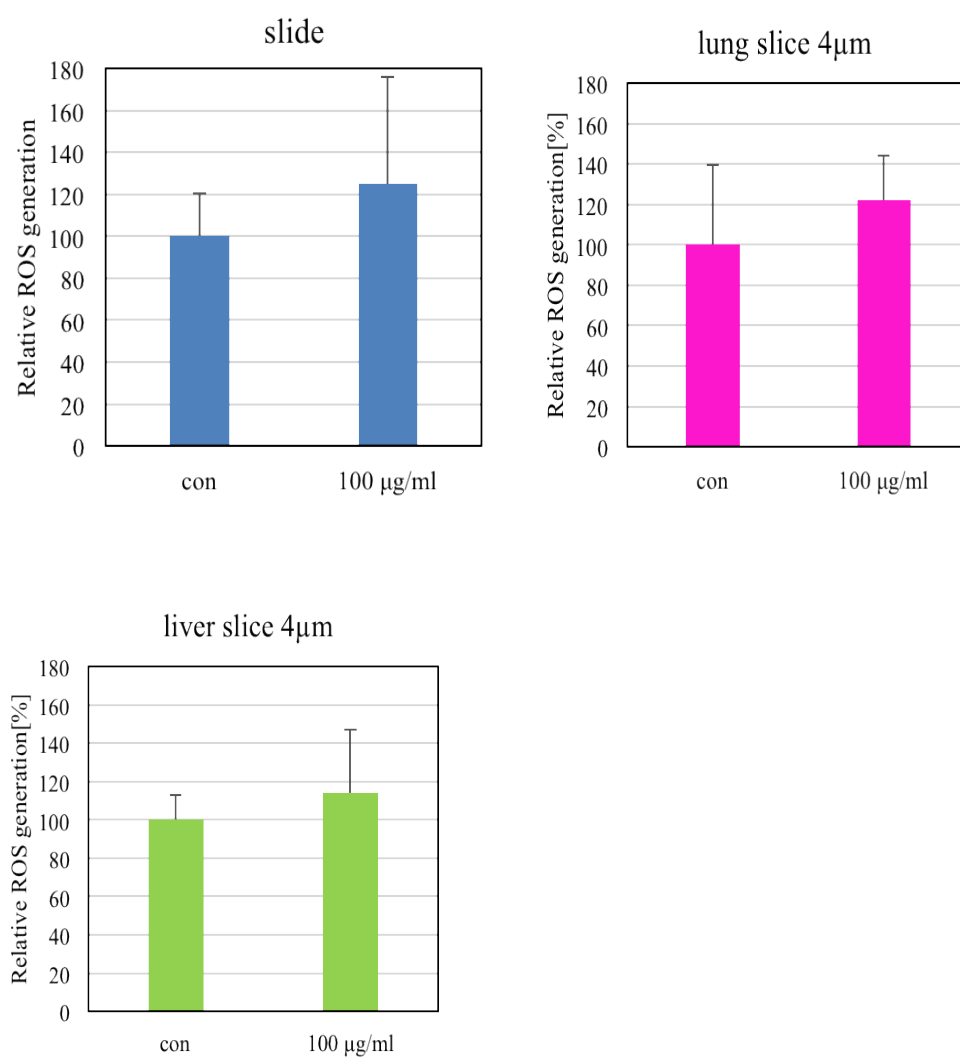


図 7. 組織切片担体上での A549 細胞の ROS 産生量