

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 技術開発・共用部門 副部門長

本研究では、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への曝露実験において、マイクロRNA (miRNA) の網羅的発現解析を行い、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の同定を試みた。miRNAの発現挙動は、培養バッチや培養時間に大きく依存したが、カルボキシ修飾の有無は曝露量よりもmiRNA発現に影響することが明らかとなった。また、磁性ナノ粒子により変動するmiRNAとしてmiR-1260が同定された。このmiRNAは、曝露72時間において発現量が増加するが、現在のところ、このmiRNAが細胞機能にどのように影響しているのかは不明である。

#### 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  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 72 時間曝露した細胞  
M200-72h : 修飾した (modified) NPs を 200  $\mu\text{g/ml}$  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。

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 103 ~ 166 個であった。昨年度の同様な条件での検出数は 77 ~ 111 個であったので、今年度の検出数の方が若干多い。これは、使用したマイクロアレイのバージョンが変わったことに依存すると考えられる。すなわち、昨年度使用したマイクロアレイ (旧版の G4870A, v16) はプローブ数が 1347 種類であったのに対して、今年度使用した新バージョンでは、2549 種類のプローブが搭載されている。新旧で共通するプローブは 1189 個、旧版から削除されたプローブは 158 個、新版に追加されたプローブは 1360

個であり、プローブ構成が変わっている。これが昨年度と今年度の検出数に影響を与えたと考えられる。

各曝露条件において、いずれか 1 つ以上の条件でシグナル強度が得られた miRNA プローブは 68 個あり、この 68 個について階層的クラスタリングを行なった。得られた clustering tree を図 1a に示す。この 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。すなわち、前者は、磁性ナノ粒子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、後者は磁性ナノ粒子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。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、磁性ナノ粒子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磁性ナノ粒子と修飾磁性ナノ粒子に曝露された細胞での miRNA 発現パターンは異なるが、これらの磁性ナノ粒子の濃度の違いは 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、修飾磁性ナノ粒子に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは

磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞とは異なることを示唆している。今年度の clustering tree を昨年度の clustering tree (図 1b) と比較すると、tree の形状は全く同一であった。これは、上記した miRNA の発現に与える培養および暴露条件の影響が再現性あるものであることを意味している。これら 2 つの trees の再現性が確認されたことから、磁性ナノ粒子が細胞に与える影響は、培養時間における細胞の生理的变化よりも小さいことがわかる。

さらに、昨年度と今年度の miRNA 発現データを使って clustering tree を作成した。昨年度使用した旧版のマイクロアレイと今回使用した新版のマイクロアレイで共通するプローブ 1189 個のうち昨年度と今年度のデータを合わせた 16 条件のいずれか 1 つ以上でシグナル強度が得られた miRNA プローブ 142 個について階層的クラスタリングを行なった。その結果、昨年度と今年度の結果は別々のグループに分配された (図 2)。これは、昨年度と今年度の培養の違いが miRNA の発現パターンに大きな影響を及ぼしていることが判明した。すなわち、昨年度と今年度では、同じ培養時間においても細胞の生理状態が大きく異なっていることを示している。さらに、今年度の tree の形状は、図 1a に示した単独でクラスタリング解析したときの形状とは異なっていた。特に、今年度の tree では磁性ナノ粒子で暴露していないコントロールの 24 時間と 72 時間がクラスターを形成していることから、今年度の培養時間の影響は、昨年度に比べて小さいことが示唆された。昨年度と今年度の培養の違いが大きかったので、142 プローブについて条件ごとに昨年度と今年度のピアソンの相関係数を求めたとこ

ろ、特に 72 時間後のコントロールとカルボキシル基修飾磁性ナノ粒子の再現性が低いことが示された (表 1)。

次に、磁性ナノ粒子の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で発現量がコントロールに比べて変動した miRNA のリストを表 2 に示す。このリストから磁性ナノ粒子の影響が顕著に反映されている miRNA を見出すことは困難であったが、昨年度のリストとの比較から miR-1260b が昨年度と同様の傾向を示すことが見出された。すなわち、この miRNA は 72 時間曝露されると修飾の有無にかかわらず、24 時間曝露のときよりも発現量が高くなる傾向を示す。ただし、昨年度の結果では、この miRNA は 24 時間ではコントロールと同程度であり、72 時間で発現量が増加したのに対し、今年度では、24 時間の曝露で発現量が低下し、72 時間で発現量が増加してコントロールと同程度になった。昨年度と今年度では、72 時間曝露されると修飾の有無にかかわらず、24 時間曝露のときよりも発現量が高くなるという傾向は同じであるが、その内容は異なっている。miR-1260b ほどではないが、miR-1260a も同様な傾向を示した。

#### D. 考察

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、本研究の問題点が明らかになった。すなわち、磁性ナノ粒子の影響は、培養の違いあるいは培養時間の違いによる細胞の生理的变化よりも小さいため、培養条件の影響により隠れてしまうことである。これは、磁性ナノ粒子の miRNA 発現に与える影響は、非常に小さいことを示唆している。磁性ナノ粒子の細胞活性に与える影響も 100 あるいは 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  という高い曝露量においても 10~20% 程度の低下であるため、細胞全体の平均として考えると、

細胞機能あるいは細胞の生理状態にほとんど影響していないとすることができる。すなわち、磁性ナノ粒子でアポトーシスやネクローシスが誘導されても、あるいは細胞活性が低下しても、それは特定の細胞に起こった現象であり、全体から見ると無視してもよい程度のものであると考えることができる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata, Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery, *Mater. Express*, 2016, 6, 116-26.
- (2) S. Chinnathambi, N. Abu, N. Hanagata, Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin. *RSC Adv.*, 2017, 7, 2392-402.
- (3) X. Yao, Z. Tian, J. Liu, Y. Zhu, N. Hanagata, Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots for potential chemo-photothermal synergistic cancer therapy, *Langmuir*, 2017, 33, 591-9.
- (4) X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Hanagata, X. Wang, Q. Weng, A. Ito, Y. Bando, D. Golberg, Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment, *Nat. Commun.*, 2017, 8, 13936.

### 2. 学会発表

- (1) S. Chinnathambi, N. Hanagata, Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.

- (2) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata, Calcium phosphate induce exosome release of human monocyte for exosomal-based drug delivery systems, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (3) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata, Calcium Phosphate Induce Exosome Release of Human Monocyte for Exosomal-based Drug Delivery Systems, Nano S&T-2016, Oct. 26-28, 2016, Singapore.

## 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

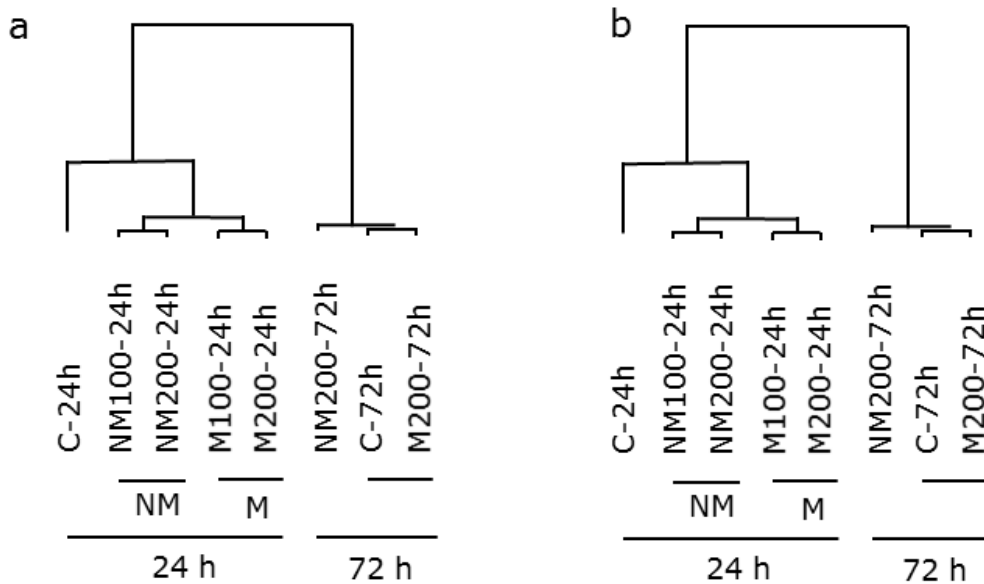


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー.

a, 今年度のマイクロアレイデータの階層型クラスタリングから得られたツリー. b, 昨年度のマイクロアレイデータの階層型クラスタリングから得られたツリー.

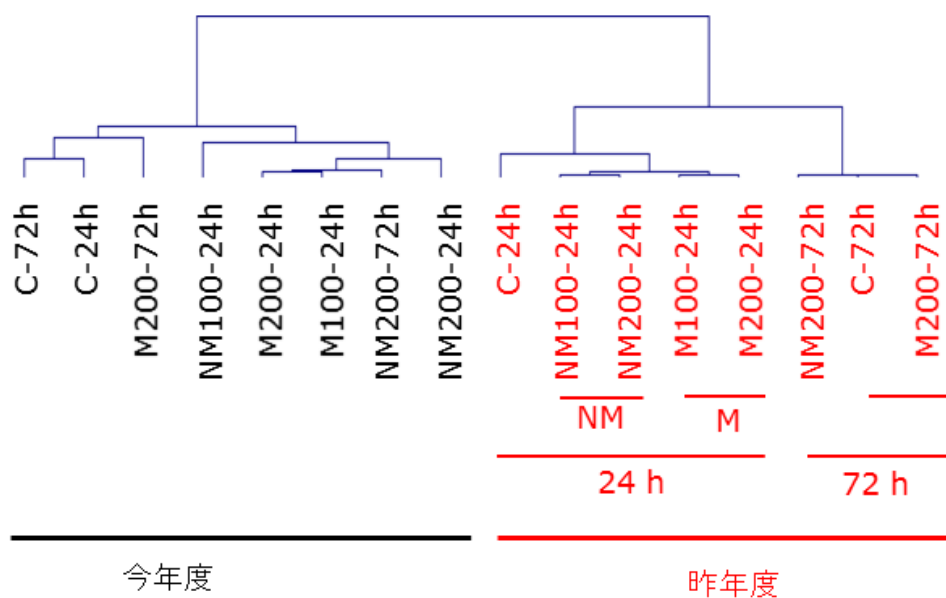


図 2. 昨年度と今年度の miRNA 発現データを階層型クラスタリングして得られたツリー.

表1 各条件ごとに求めた昨年度と今年度の発現データにおけるピアソンの相関係数

Sample	24h Control	24h Bare 100	24h Bare 200	24h COOH 100	24h COOH 200	72h Control	72h Bare 200	72h COOH 200
相関係数(142プローブについて)	0.881	0.895	0.941	0.891	0.878	0.678	0.820	0.661

表2 発現がコントロールに比べて変動した (Log2 値が 1 以上または-1 以下) miRNA のリスト

SystematicName	24h Bare100 / Control	24h Bare 200 / Control	24h COOH 100 / Control	24h COOH 200 / Control	72h Bare 200 / Control	72h COOH 200 / Control
hsa-miR-26a-2-3p				3.39		
hsa-miR-34b-3p						1.82
hsa-miR-1281	-0.32		-1.01	-0.34	0.11	1.56
hsa-miR-595	-0.76		-0.68	-0.59	0.03	1.54
hsa-miR-4726-5p						1.40
hsa-miR-513b-5p	0.31	-0.24		1.25	-0.10	-0.12
hsa-miR-5001-5p	1.19	0.50	0.38	0.34	-0.10	-0.16
hsa-miR-572	1.07	0.49			0.27	-0.02
hsa-miR-4430	-0.77	-1.01				
hsa-miR-6739-5p	-0.46	0.10	-0.50	0.00	-1.03	0.29
hsa-miR-6130	-1.08		-0.90		-0.63	0.35
hsa-miR-4465	0.05	-0.10	-1.08	-0.03	0.30	0.19
hsa-miR-320e	-0.98	-0.38	-1.10	-0.93	-0.77	-0.44
hsa-miR-320d	-1.12	-0.65	-1.05	-1.02	-0.80	-0.71
hsa-miR-5006-5p	-1.13	0.06	-0.81	0.24		0.72
hsa-miR-4284	-1.16	-0.79	-0.36	-0.27	-0.63	-0.79
hsa-miR-6514-3p	-0.37		-1.19		-0.39	0.61
hsa-miR-4669	-1.20					
hsa-miR-1273g-3p	-1.14	-1.00	-0.50	-0.49	-0.54	-1.20
hsa-miR-3591-3p	-0.39		-1.25		-0.23	0.70
hsa-miR-8071	-1.12		-0.98	-1.33	-0.43	0.69
hsa-miR-7641	-1.05	-1.08	-1.37	-0.63	0.18	-0.54
hsa-miR-574-5p	-0.13	-1.40	-0.43	-0.34	-0.24	0.35
hsa-miR-6132	-0.10	0.86		0.16	-1.29	-1.45
hsa-miR-320b	-1.16	-0.77	-1.47	-1.18	-0.93	-0.37
hsa-miR-1260b	-1.35	-1.01	-1.51	-0.85	0.00	-0.33
hsa-miR-6847-5p	-1.60					0.63
hsa-miR-7977	-1.45	-0.74	-1.60	-0.91	0.57	-0.54
hsa-miR-197-3p	-1.57		-1.47	-1.67	-0.12	1.32
hsa-miR-331-3p	-1.35	-1.21	-1.04	-0.80	-1.18	-1.77
hsa-miR-7975	-1.01	-0.78	-1.81	-0.66	0.28	-0.95
hsa-miR-205-3p	-1.85					1.24
hsa-miR-1260a	-1.77	-1.82	-1.86	-1.26	-0.11	-0.26
hsa-miR-6740-5p	-1.19	-1.87				
hsa-miR-6817-5p	-1.91					0.50
hsa-miR-4701-3p	-0.59	-1.95	-0.22	-1.16		
hsa-let-7e-5p	-1.97	-0.46	-0.99	-1.24	-1.58	-1.55
hsa-miR-6807-5p	-1.12		-1.32	-2.02	-0.74	0.42
hsa-miR-4455	-0.08	-2.06	-0.50	-0.43	0.03	0.42
hsa-miR-6805-5p	-1.10		-2.07		-1.77	0.57
hsa-miR-5194	-0.92		-2.14	-2.23	-0.70	-0.25
hsa-miR-8485	-0.53	-2.35	-0.86	-0.73	-0.19	0.76
hsa-miR-32-3p	0.11	-2.63	-0.09	-0.23	0.04	0.09
hsa-miR-574-3p	-0.60	-3.15	-0.87	-0.98	0.00	0.99
hsa-miR-4730	0.13	-4.32	0.02	-0.75	-0.29	0.00