

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および機能解析

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

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、Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現解析及び磁性体ナノ粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現を認め、曝露実験でも切片担体の種類に依存したIntegrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現の変化を認めた。前立腺癌細胞株DU145に対して、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPsと $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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。蛍光顕微鏡にてMDC(Monodansylcadaverine)染色の観察及び定量化を行った結果、ナノ粒子が修飾にかかわらず、autophagyが誘導されることを認めた。酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無を起点としたapoptosisのみならずautophagyの関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

#### 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、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、肺及び肝臓由来の組織切片担体をのせたスライドガラスを準備し、細胞を播種し、Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現を

指標にして解析した。(2)に関して、物質・材料研究機構の花方分担研究者と共同研究のため、この分担研究報告書では割愛させていただく。(3)について、有害性発現経路の一つとして、autophagyに焦点を当てた。前立腺癌細胞株DU145に対して、非修飾磁性体ナノ粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs)とカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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、蛍光顕微鏡にてMDC(Monodansylcadaverine)染色の観察及び定量化を行い、ナノ粒子の細胞への影響(autophagy)について解析を行った。

#### 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 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、CO<sub>2</sub>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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>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<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(マグネタイト)で構成されている。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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、超音波破砕機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社)にて、分散処理を行い、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs 曝露前には、培養液中における Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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) 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：A549 細胞の切片担体培養の条件設定後、磁性体ナノ粒子(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs)の曝露実験を行った。曝露前後の細胞の Integrin-β1 および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイム PCR で解析をした。

4) ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析：前立腺癌細胞株 DU145 において、

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>NPs と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>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、Autophagy 関連タンパク質の発現をウエスタンブロット解析および Monodansylcadaverine (MDC, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を用いて、蛍光顕微鏡観察を行い、定量化した。

(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) A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、細胞の状態を示す Integrinβ-1 および EGFR の発現を確認した。肺及び肝臓からの組織切片を切片担体として使用した。Integrinβ-1 および EGFR の発現は 2 次元培養より有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築された状態で培養されていると考えられた (図 1)。ナノ粒子の暴露により、肝臓組織切片担体上では、その発現が低下し、ナノ粒子の影響を受けたが、肺組織切片担体上の細胞では、ナノ粒子の細胞への影響は認めなかった。この切片担体培養系が生体内の臓器特異的 (あるいは組織特異的) 環境を再現できる系である可能性が考えられた。

2) ナノ粒子の修飾にかかわらず、autophagy を誘導し (図 2)、また前年度の結果と合わせるとナノ粒子暴露により活性酸素種を産生する場合は、有意に apoptosis が加わり、細胞障害をもたらすと考えられた。

## 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( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、A549 細胞の切片担体培養系の毒性評価系としての使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.
- (2) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (3) 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.*, 39, 12, 2017.
- (4) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observantion of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. *Chaos*. 27, 104602, 2017.

### 2. 学会発表

- (1) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.

- (2) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (4) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NF $\kappa$ B signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.

## 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

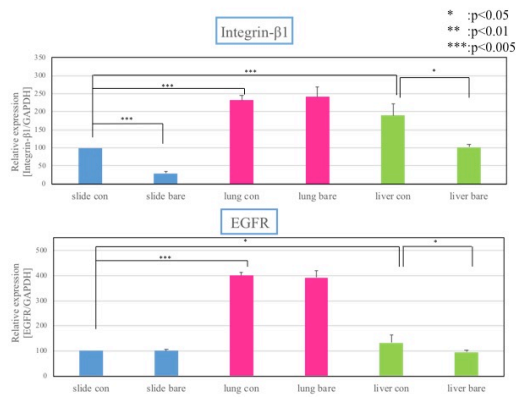


図1. 切片担体とIntegrin及びEGFR発現について

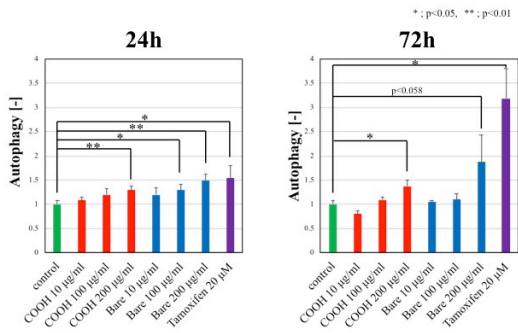


図2. 各ナノ粒子曝露によるAutophagyの出現について