

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
共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

研究代表者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長

研究要旨：昨年度より、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 毒性評価システム確立の検討を行っており、肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系の妥当性について、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の状態が遺伝 毒性に対する影響についても観察した。MGT の細胞毒性を調べた結果、GDL1 単培養では、MGT の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264 単培養では、表面修飾を有さない MGT(BMS-10)は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった。次に RAW264 と GDL1 細胞を共培養し、BMSC-5 及び BMS-10 を両細胞に曝露し、誘発される変異頻度を解析した。その結果、MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度の増加が認められた。また、BMS-10 と比較して BMSC-5 の方が変異頻度が高い傾向が観察された。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の表面修飾が遺伝毒性発現に何かしらの影響を及ぼしていることがわかった。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。しかしながら、変異原性試験の結果では BMSC-5 の方が強い変異原性を示していたことから、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響が考えられる。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強くなるメカニズムについて検討を行なっている。また、今後さらに、本解析の妥当性を検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことで、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは微粒子などの化学物質の遺伝毒性評価は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。①

一方、ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リスク評価は主として肺胞上皮由来細胞を単独で用いた系で為されているが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージによる貪食と液性因子放出が関与することが示唆されている。そこで、我々は、

生体を模倣した新規 *in vitro* 試験系の構築が必要であると考え、マクロファージ様細胞と肺由来の細胞の共培養系を利用して、新しい *in vitro* 気道毒性試験系を開発することを試みている。本年度は、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の状態が遺伝 毒性に対する影響についても観察した。なお、本研究ではポリアクリル酸修飾を施した MGT (BMSC-5) と修飾を施していない MGT(BMS-10)を使用した。

B. 研究方法

細胞毒性試験

96well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^4 cells/well 及び 4.0×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2 段階希釈で各 well に加え、24 時間曝露した後、培地を吸引除去し、基本培地を 100 μL

加えた。

- ② 共培養システムによる遺伝毒性試験法
GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、② ThinCertTM (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λEG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λEG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

- ③ ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
6 well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^6 cells/well 及び 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24 時間曝露した後、トリプシン処理により細胞を回収し、1ml の PBS で再懸濁した後、10% ホルマリン溶液を入れ細胞固定を行なった。フローサイトメーター(FCM)を用いて、得られた細胞固定サンプルの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

- ① 細胞毒性試験
各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を単培養の GDL1 に 6.25~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、RAW264.7に 3.125~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露し、曝露した際の細胞生存率を NR assay により測定した。GDL1 単培養では、MGT の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264 単培養では、BMS-10 は 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表

面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった(図 1)。

共培養システムによる遺伝毒性試験法
共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。結果を図 2 に示す。MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10 では、単培養に比較して RAW264.7 との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5 では単培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件下では MF が減少する傾向が観察された。また、両 MGT を比較すると、BMSC-5 の方が高い変異頻度を示していた(図 2)。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。その結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の表面修飾が遺伝毒性発現に何かしらの影響を及ぼしていることがわかった。

ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。FCM では、細胞の大きさの指標である前方散乱光(FS)と細胞内の複雑さの指標である側方散乱光(SS)を測定した。結果を図 4 に示す。BMS-10 曝露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞も SS 値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞である RAW264.7 の方が GDL1 よりも取り込み量が多いことが観察された。対して BMSC-5 曝露群は溶媒対照群と比較して、SS 値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

D. 考察

ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、MGT の遺伝毒性を行い、同時に遺伝毒性に対する表面修飾(ポリアクリル酸)の有無の影響を観察した。表面修飾の異なる MGT (BMS-10 及び BMSC-5) の RAW264.7 および GDL1 細胞に対する毒性は、GDL1 に対しては BMS-10 の方が強い毒性が見られ、RAW264.7 に対しては BMSC-5 の方が強い毒性が見られた。これは表面修飾の違いによってそれぞれの細胞に対する毒性メカニズムが異なっているのではないかと考えられる。また、共培養系による *in vitro* 遺伝毒性試験系では、

BMS-10とBMSC-5で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下でMFが増加しており、対して、BMSC-5は単培養条件下でMFの増加が観察された。このことから、BMS-10はRAW264.7による間接的な影響が強くており、BMSC-5はGDL1への直接的な影響が強くているため、遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMGTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各MGTで大きく異なる変異スペクトルが確認された。特にBMSC-5曝露群ではBMS-10曝露群では見られなかったGC>ATの変異が見られた。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5はBMS-10よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。今後は、これらナノマテリアルによるROS産生や炎症性サイトカインの放出などについて検討を行う予定である。毒性誘発のメカニズムが明らかになれば、有用なナノマテリアルの毒性低減化方法の提言へとつながると思われる。

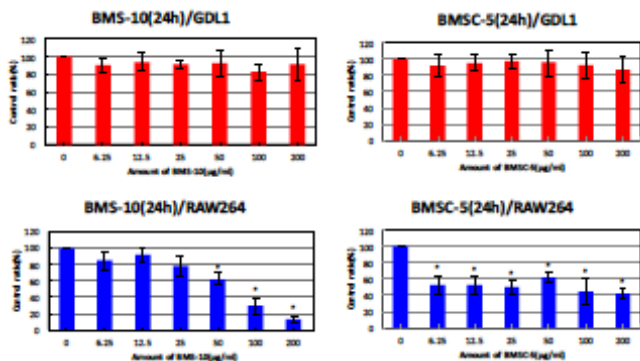


図1. 表面修飾の異なるMGTの細胞毒性

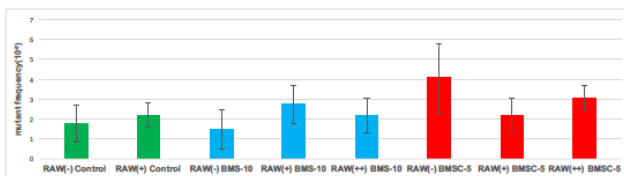


図2. GDL1細胞に観察された変異頻度

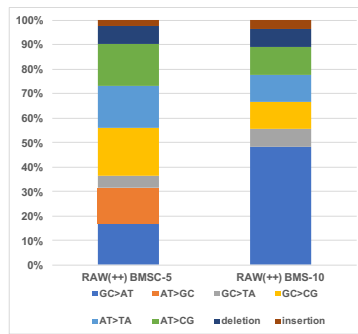


図3. 変異スペクトラム

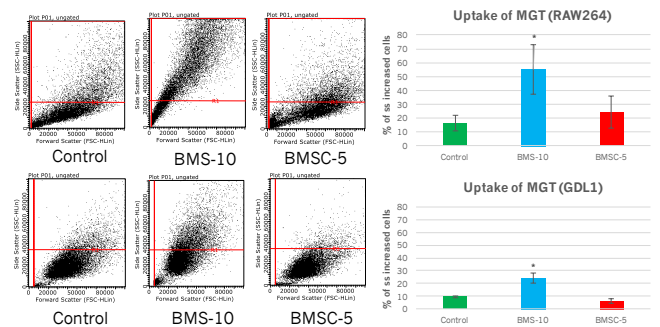


図4. 各MGTの細胞への取り込み

E. 結論

昨年度までに肺毒性試験系として、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞)とマクロファージ(RAW264.7)を共培養システムの構築を行った。本年度は、MGTを用いて、本システムの妥当性の検証及び、毒性の低減化も考慮して、表面修飾の違いに対する影響についても観察した。修飾を施していないMGTと比較して、ポリアクリル酸の表面修飾を施したMGTは細胞種によって異なる細胞毒性を示し細胞内には取り込まれにくい、遺伝毒性は強く、また変異スペクトルは全く異なるという結果となった。貪食細胞に貪食されにくくなることから、表面修飾によりMGTの特性は変化した。遺伝毒性が強くでしまっているため、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響が考えられる。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強く観察されるメカニズムについて検討を行っている。

また、今後更に、本解析の妥当性を検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことで、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する。

F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 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) T. Toyoda, Y. Totsuka, K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38, 537-43, 2018.
- (3) N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 32, 455-62, 2017.
- (4) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes Environ.*, 39, 12, 2017.

2. 学会発表

1. 戸塚 ゆ加里 : DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会 (横浜 2017 年 7 月)
2. Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, EA. IZAWAHRY, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017 年 9 月)
3. Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017 年 9 月)
4. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚 ゆ加里、筆宝義隆. マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017 年 9 月)
5. 佐藤春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚 ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、

古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)

7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚 ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
8. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
9. Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017 (東京、2017 年 11 月)
10. Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis ¹²ICEM-⁵th ACEM (仁川、2017 年 11 月)
11. Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017 (つくば、2017 年 12 月)
12. Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018 年 1 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。