

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、カーボンナノチューブのヒト肺上皮細胞 A549 またはヒト前立腺がん細胞 DU145 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、細胞株の違いに大きく依存し、カーボンナノチューブの形状の違いも発現に影響することが明らかとなった。また、ナノカーボンチューブにより変動する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p などが同定された。特に hsa-miR-5787 は昨年度の昨年度の研究でナノ粒子を曝露したときも発現が亢進しており、ナノマテリアルのバイオマーカーとなる可能性がある。

近年、エクソソーム中の miRNA が遠隔細胞の制御に関与していることが示唆されている。様々なナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響を調べた結果、単球およびマクロファージがリン酸カルシウム粒子を取り込むと、放出するエクソソーム量が増加することを見出した。リン酸カルシウム粒子はこれらの細胞にファゴサイトーシスで取り込まれるが、取り込まれた直後からエンドソームでの多胞体形成が促進されることが示唆されたが、今後、多胞体形成のトリガーの解明が必要である。

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。昨年度はナノマテリアルとして磁性体粒子を検討したが、本年度はカーボンナノチューブ (CNT) について、検討を行った。

B. 研究方法

B.1 CNT と miRNA の関係について:

DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ (CNT) を 24 時間暴露し、細胞から RNA を抽出したのち、Agilent G4870C SurePrint G3 Human v21 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。

DU145 Ctrl: DU145 細胞のコントロール。

DU145 L20: DU145 細胞に CNT(Long)を
20 µg/mL の濃度で曝露。

DU145 L200: DU145 細胞に CNT(Long)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

DU145 S200: DU145 細胞に CNT(Short)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

A549 Ctrl: A549 細胞のコントロール。

A549 L20: A549 細胞に CNT(Long)を
20 µg/mL の濃度で曝露。

A549 L200: A549 細胞に CNT(Long)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

B2. リン酸カルシウム粒子とエクソソームについて:

180ml の 11mM CaCl₂ 溶液 (pH = 9) を 20mL の 66mM Na₂HPO₄ 溶液 (pH = 11) に毎分 1mL の速度で添加した。混合物の pH を NaOH の添加により 10 を超えて維持した。この操作で得られたリン酸カルシウムの沈殿を、8000×g で 30 分間の遠心分離によって回収し、0.1mM NaOH 溶液、続いてアセトンで洗浄した。その後、リン酸カルシウムを再び水で 3 回洗浄し、次いで凍結乾燥した。

RAW264.7 および THP-1 細胞を、5×10⁴ 細胞 / mL の密度で、12 ウェルプレート中の 2mL 培地に播種した。24 時間後、培地を、500 および 1000µg/ mL の濃度のリン酸カルシウム粒子を含むエクソソーム枯濁 FBS (Thermo Fisher) を補充した培地と交換した。別の 1、2、4、6、24、48 および 72 時間培養した細胞を、遠心分離によって培地から除去した。培地中のエクソソームは、Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher) を用いて集めた。エクソソームの数は、EXOCET エクソソーム定量アッセイキット (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を

用いて測定した。

収集したエクソソーム (1×10⁶ 個のエクソソーム) または細胞 (3×10⁵ 個の細胞) に 70% HNO₃ 3500 µL、37% HCl 200 µL および 30% H₂O 2100 µL を Ca フリー PBS -) (Thermo Fisher) を添加し、次いで混合物をマイクロ波 (1000W) で 2 時間処理し、次いで ICP-OES でカルシウム濃度を測定した。

C. 研究結果

C1. CNT による miRNA 発現の変動:

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、75 パーセントイルシフトで各サンプルのシグナル強度をノーマライゼーションした。

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 232~309 個であった。条件は少し異なるが昨年度は同じバージョンのマイクロアレイを使って検出数が 103~166 個であったので、今年度の検出数は 2 倍くらいに増えている。これは、細胞からの RNA 抽出条件の最適化ができたためと考えられる。

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 188 個あり、これら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 1 に示す。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 µg/mL を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long) の 20µg/mL と 200µg/mL が与える影響の差は小さく、濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいと分かる。

次に、各条件のコントロールに対する発現比

(2 を底とする対数で表現した Log2 値)を求めた。その分布を表 1 に示す。DU145 細胞は A549 細胞よりも CNT の影響を受けにくいことから分布の幅が狭くなっている。

続いて、CNT 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(Log2 値が 1 以上もしくは-1 以下)miRNA は 129 個あった。そのうちの一部を表 2 に示す。このリストから DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p の 3 つが見出された。hsa-miR-5787 は細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子 ELF5 をターゲット遺伝子とする。昨年度の研究で非修飾ナノ粒子を曝露したときも hsa-miR-5787 の発現が亢進した。このため、hsa-miR-5787 は CNT やナノ粒子以外のナノマテリアルに対しても発現が亢進するかもしれない。また、A549 細胞で CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA は計 68 個あったが、このうち多くで発現量が Short 200 μ g/mL \gg Long 200 μ g/mL > Long 20 μ g/mL の関係にあり、バイオマーカーの候補としてスクリーニングから外す理由はない。バイオマーカーの発見のためには、Short 200 μ g/mL での発現量が多い順になるべく多くの miRNA について定量 PCR によりスクリーニングを行なうのが良いかもしれない。

C2. ナノ粒子がエクソソームに及ぼす影響

次に、全エクソソーム単離試薬を用いて 500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から分泌された小胞を回収した。リン酸カルシウム粒子で処理された細胞から集められた小胞は、エクソソームマーカー分子 CD9 を発現し(図 2A)、これらの小胞はエクソソームであることが示唆された。回収された小胞はまた、後期エンドソームおよびリソソームのマーカーである LAMP-1 を発現した(図 2B)。

リン酸カルシウム粒子がエクソソーム分泌を刺

激するかどうかを調べるために、RAW264.7 および THP-1 細胞を 500 および 1000 μ g/ml の濃度の CaP 粒子で 72 時間処理し、エクソソームを回収した。500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から放出されたエクソソームの数は、非処理細胞の約 2 倍であった(図 3A)。しかし、500 μ g/ml~1000 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子濃度において、エクソソーム数に有意差は認められなかった。RAW264.7 細胞を 500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した場合、ほとんどのエクソソームは 24 時間以内に分泌された(図 3B)。一方、ほとんどのエクソソームは、リン酸カルシウム粒子非処理細胞において 6 時間以内に分泌された。72 時間培養した THP-1 細胞において、エクソソームの数は、非処理細胞と比較して、CaP 粒子処理細胞において 2 倍以上高かった(図 3C)。さらに、大部分のエクソソームは、24 時間以内にリン酸カルシウム粒子処理細胞からも分泌された(図 3D)。これらの結果は、リン酸カルシウム粒子が RAW264.7 および THP-1 細胞の両方においてエクソソーム分泌を刺激する可能性を有することを示唆している。

本実験においてリン酸カルシウム粒子で曝露した細胞から分泌されたエクソソームは、リン酸カルシウム粒子由来のカルシウムイオンを含むかどうかを調べた。その結果、リン酸カルシウム粒子で処理した細胞と処理していない細胞の間で、エクソソーム中のカルシウム濃度に有意差は観察されなかった(図 4A、B)。すなわち、リン酸カルシウム粒子もリン酸カルシウム粒子から放出されたカルシウムイオンも、リン酸カルシウム粒子で曝露された細胞から分泌されたエクソソームには含まれていない。細胞内のカルシウム濃度を分析すると、細胞内カルシウム濃度はリン酸カルシウム粒子濃度依存的に増加したことから(図 4C)、リン酸カルシウムあるいはリン酸カルシウム粒子から溶出したカルシウムイオンは細胞内にとどまっていることが示唆された。

上記の実験においてリン酸カルシウム粒子は、細胞から分泌されたエクソソームの数を増加させた。さらに、大部分のエクソソームは、リン酸カルシウム粒子による処理後 24 時間以内に細胞から分泌された。リン酸カルシウム粒子は分泌されたエクソソームの数を増加させたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞から分泌されたエクソソーム中のカルシウム濃度は、未処理細胞とは有意に異ならなかった。この結果は、細胞質ゾルに放出されたリン酸カルシウム粒子またはリン酸カルシウム粒子由来カルシウムイオンの排泄に対してエクソソーム分泌が増強されないことを示唆している。エクソソームは、エンドソーム膜の内方発芽によって形成される小胞内小胞 (ILV) に由来する。これは、エクソソームの内容物が細胞質ゾル成分に由来することを意味する。リン酸カルシウム粒子で処理した細胞から単離したエクソソーム中のカルシウム濃度の増加を示さない本発明者らの結果は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂に起因する細胞質ゾル中のカルシウム濃度の増加前に ILV が形成されたことを示唆する。ILV の形成は、リン酸カルシウム粒子による処理後 4 時間で後期エンドソームまたはリソソームが破裂し始めたので、リン酸カルシウム粒子での処理後 4 時間以内に起こると考えられる。

D. 考察

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、カーボンナノチューブの細胞に与える影響は細胞株により大きく異なることが明らかになった。また、昨年度までの結果も考慮するとナノマテリアルの種類によっても細胞に与える影響は異なるが、一方でカーボンナノチューブとナノ粒子に共通して変動を示す miRNA も見い出されて、異なるナノマテリアルが共通した細胞の反応を引き起こす可能性が示された。

エクソソームは、エンドソーム膜の陥入によって形成され、エンドソームに保持された ILV に由来する。ILV を含むエンドソームは、多胞体

(MVB) と呼ばれる。ILV は MVB と細胞膜との融合により細胞からエクソソームとして放出される。リン酸カルシウム粒子による処理による分泌されたエクソソームの数の増加は、MVB 形成の促進およびまたは MVB と細胞膜との融合に起因する。細胞質 Ca^{2+} 濃度の増加は、MVB と細胞膜の融合を促進することが報告されている。大部分のエクソソームはリン酸カルシウム粒子非処理細胞で 6 時間以内に分泌されたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞ではエクソソーム分泌は 24 時間まで続き、大部分のエクソソームは処理後 6 時間から 24 時間に分泌された。上記のように、リン酸カルシウム粒子処理細胞における細胞質カルシウム濃度は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂のために 6 時間後に増加すると考えられ、これは、リン酸カルシウム粒子処理細胞におけるエクソソーム分泌レベルの増加が促進に起因することを示唆する細胞質カルシウム濃度の増加による MBV の細胞膜との融合の可能性がある。上記のように、カルシウムを含まない ILV は、リン酸カルシウム粒子処理細胞において 4 時間前に形成されると考えられているが、リン酸カルシウム粒子が ILV および MBV の形成を刺激するかどうかの直接の証拠はない

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) なし

2. 学会発表

(1) なし

F. 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

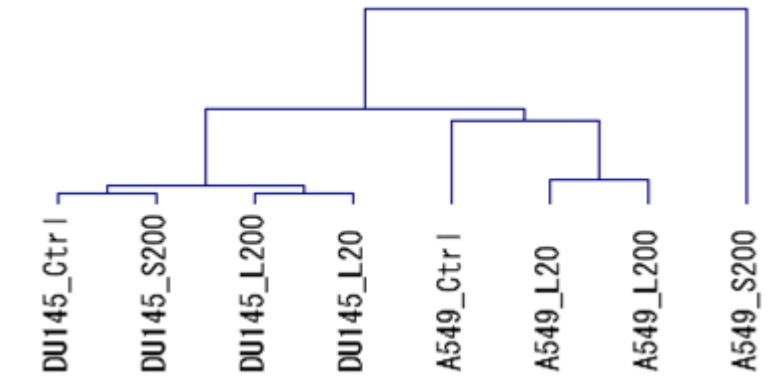


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー

表 1. 各条件のコントロールに対する発現比の分布

Sample / Sample	DU145 Long20 /Ctrl	DU145 Long200 /Ctrl	DU145 Short200 /Ctrl	A549 Long20 /Ctrl	A549 Long200 /Ctrl	A549 Short200 /Ctrl
検出miRNA数	236	259	258	228	222	202
平均値	-0.237	0.185	0.022	0.512	0.371	0.517
標準偏差	0.495	0.500	0.393	0.836	1.044	1.679
最小値	-2.129	-1.715	-1.378	-1.307	-1.646	-2.174
第一四分位値(25% percentile)	-0.581	-0.089	-0.164	0.037	-0.436	-0.760
中央値(50% percentile)	-0.156	0.225	0.005	0.290	-0.064	-0.141
第三四分位値(75% percentile)	0.076	0.472	0.194	0.989	1.028	1.792
最大値	1.071	1.586	2.162	3.583	3.848	6.390
頻度(-3超過 -2以下)	1					3
頻度(-2超過 -1以下)	16	6	5	5	2	27
頻度(-1超過 0以下)	141	71	123	48	112	76
頻度(0超過 1以下)	76	172	125	120	52	28
頻度(1超過 2以下)	2	10	4	45	32	21
頻度(2超過 3以下)			1	7	21	31
頻度(3超過 4以下)				3	3	10
頻度(4超過 5以下)						3
頻度(5超過 6以下)						1
頻度(6超過 7以下)						2

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(一部)

SystematicName	DU145 Long20 /Ctrl	DU145 Long200 /Ctrl	DU145 Short200 /Ctrl	A549 Long20 /Ctrl	A549 Long200 /Ctrl	A549 Short200 /Ctrl	Target Gene (m RTaBase) Strong evidence		
hsa-m R-7110-5p	-0.818	0.367	1.080	3.583	3.753	6.390	---		
hsa-m R-5787	-1.239	1.586	2.162	3.273	3.848	6.193	ELF5		
hsa-m R-7107-5p	-0.688	-0.150	0.716	2.518	2.990	5.466	---		
hsa-m R-4281	-0.313	0.514	0.862	1.765	2.096	4.345	---		
hsa-m R-3679-5p	-0.247	0.282	1.019	2.271	2.761	4.313	---		
hsa-m R-1207-5p	-0.644	0.084	0.759	1.826	2.208	4.159	TERT		
hsa-m R-6088	-0.576	0.147	0.586	1.921	2.184	3.975	---		
hsa-m R-642a-3p	-1.159	-0.504	0.192	1.051	1.398	3.966	---		
hsa-m R-4687-3p	-0.457	0.251	0.338	3.101	3.153	3.939	---		
hsa-m R-4466	-0.723	-0.233	-0.168	2.574	2.856	3.723	---		
hsa-m R-1225-5p	-0.687	0.072	0.499	1.762	1.866	3.567	---		
hsa-m R-1973	-0.699	0.277	-0.358	2.170	2.234	3.401	---		
hsa-m R-642b-3p	-0.884	-0.329	0.440	0.731	1.173	3.167	---		
hsa-m R-3960	-0.460	0.431	0.166	2.055	2.131	3.165	---		
hsa-m R-4516	-0.773	-0.094	0.081	1.424	1.742	3.060	STAT3		
hsa-m R-6090	-0.678	0.228	0.061	1.846	1.982	3.023	---		
hsa-m R-4485-5p	-0.623	0.229	-0.049	1.490	1.709	2.989	---		
hsa-m R-1268a	-0.882	0.119	0.226	1.575	2.090	2.963	---		
hsa-m R-6769b-5p				0.708	1.333	2.911	---		
hsa-m R-4485-3p	-0.976	-0.433	-0.382	1.710	1.825	2.870	---		
hsa-m R-4530	-0.440	0.119	0.453	1.516	2.097	2.829	---		
hsa-m R-1246	-0.483	0.504	0.426	2.760	2.174	2.345	DYRK1A		
hsa-m R-3656	-0.580	-0.233	-0.018	1.156	1.894	2.757	---		
hsa-m R-1275	0.253	0.867	0.523	0.994	1.340	2.742	---		
hsa-m R-762	-1.101	0.254	0.066	1.580	1.753	2.739	AMD1	FTM5	
hsa-m R-6869-5p	-0.585	0.164	0.193	2.707	2.577	2.661	---		
hsa-m R-6749-5p	0.163	0.674	0.744	1.052	1.134	2.613	---		
hsa-m R-4515	-1.078	0.141	0.147	1.853	1.778	2.568	---		
hsa-m R-1915-3p	-0.487	0.310	0.076	1.759	2.056	2.534	BCL2		
hsa-m R-5006-5p	-0.633	-0.237	-0.533	1.759	2.013	2.520	---		
hsa-m R-6821-5p	-0.552	0.195	0.051	1.681	1.903	2.485	---		
hsa-m R-3135b		0.390	-0.195	1.849	2.086	2.423	---		
hsa-m R-6724-5p	-1.504	-0.307	-0.274	1.796	1.939	2.419	---		
hsa-m R-6740-5p	-0.730	0.148	0.045	1.087	1.041	2.377	---		
hsa-m R-2861	-0.632	0.034	0.163	1.735	2.372	2.214	---		
hsa-m R-5001-5p	0.069	0.072	0.072	1.429	2.260	1.917	---		
hsa-m R-1202	0.116	0.436	0.519	0.681	0.894	2.232	GRM4		
hsa-m R-3198	-0.917	-0.133	-0.118	1.839	1.595	2.225	---		
hsa-m R-638	-0.477	-0.236	0.097	1.623	2.221	2.213	OSCP1	SP2	SOX2
hsa-m R-6800-5p	-0.288	0.327	0.062	1.874	2.065	2.188	---		
hsa-m R-6780b-5p	-0.625	0.280	0.292	1.230	1.132	2.158	---		
hsa-m R-494-3p	-0.588	0.551	0.182	1.050	1.368	2.117	PTEN	CDK6	ARNTL
hsa-m R-1268b	-0.300	0.145	0.138	1.665	2.046	2.111	---		
hsa-m R-6879-5p	-0.651	0.033	0.057	1.425	1.204	2.102	---		
hsa-m R-7704	-0.359	0.158	0.158	1.722	2.025	2.065	---		
hsa-m R-4728-5p	-0.982	0.003	-0.072	1.392	1.499	2.048	---		
hsa-m R-4459	-0.729	-0.136	0.195	0.543	1.109	2.045	---		
hsa-m R-6089	-0.275	0.485	0.292	1.651	1.917	2.024	---		
hsa-m R-455-3p				-0.195	-1.646	-2.058	---		
hsa-m R-1260b	0.358	0.319	-0.245	-1.307	-0.861	-2.107	---		
hsa-m R-4763-3p	-2.129	-0.949	-0.290				---		
hsa-m R-1260a	0.105	-0.587	-0.643	-0.766	-0.843	-2.174	---		

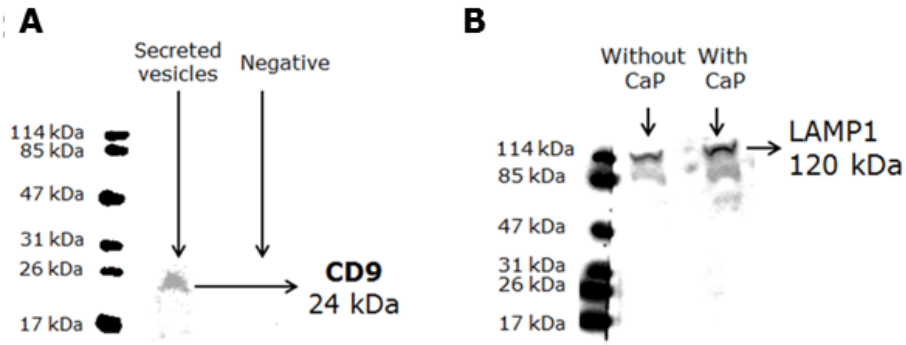


図 2. ウェスタンブロット A.リン酸カルシウム粒子(500 μ g/ml)で処理した RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソーム中の CD9 の発現. ネガティブ、メディアムだけ. B.リン酸カルシウム粒子(500 μ g/ml)または未処理の RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソーム中の LAMP-1 の発現.

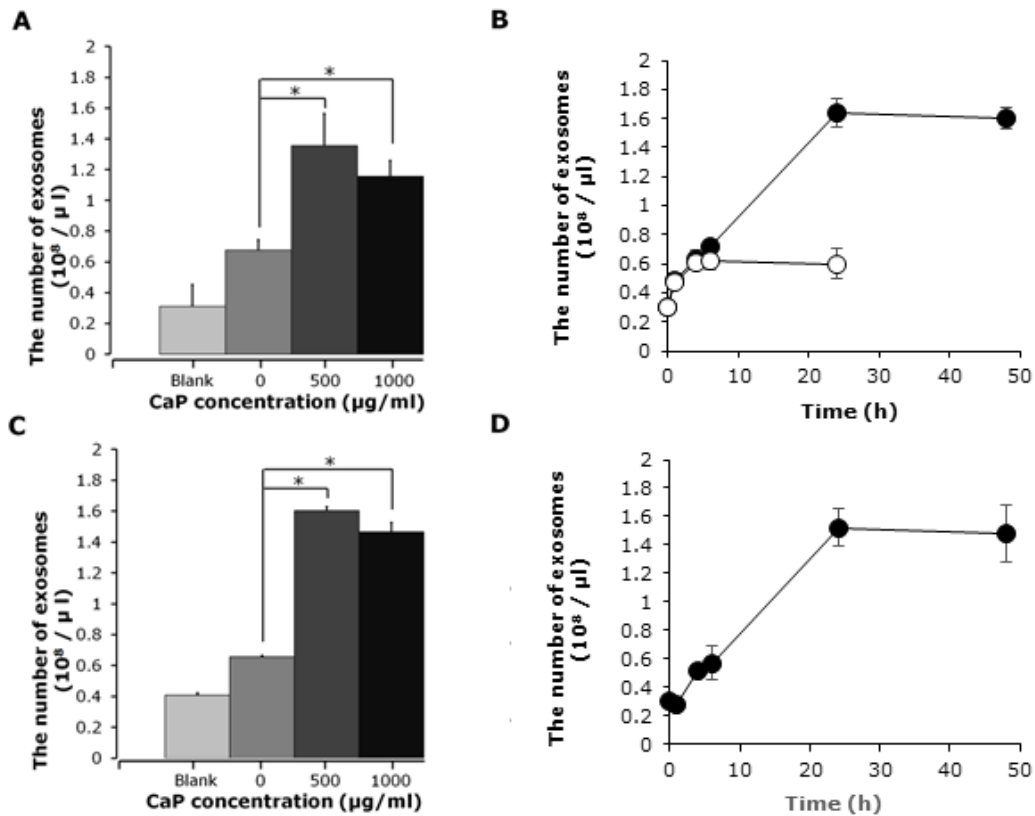


図 3. エクソソームの分泌 A. 72 時間の培養後に RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソームの数. ブランク、培地のみ. B.500 μ g/L のリン酸カルシウム粒子で処理(黒丸)および非処理(白丸)の RAW264.7 細胞からのエクソソーム分泌の時間経過. C. 72 時間の培養後に THP-1 細胞から分泌されたエクソソームの数. B.500 μ g/L のリン酸カルシウム粒子で処理した THP-1 細胞からのエクソソーム分泌の時間経過.

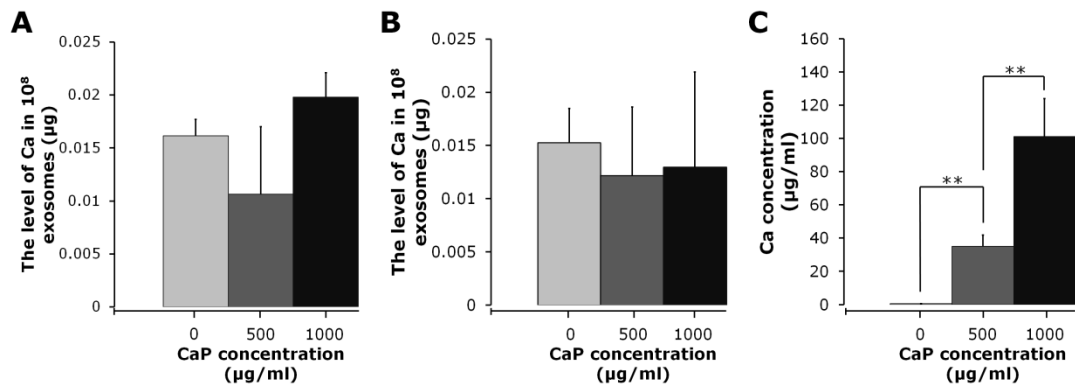


図 3. エキソソームおよび細胞におけるカルシウム含量 A.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/ mL で処理した RAW264.7 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. B.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/ mL で処理した THP-1 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. C. 0、500、および 1000µg/ mL のリン酸カルシウム粒子で 72 時間処理した RAW264.7 細胞のカルシウムの量.