

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の解析

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨： 分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞内動態と傷害機構の解明を目的とした。A549細胞の切片担体培養系の条件設定及び磁性体ナノ粒子(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が、統計学的有意差は認められなかった。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、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、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の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。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量に変化することを認めた。細胞傷害機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)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と粒子側の複合的関わりと考えられた。

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。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびエピジェネティックおよびエピジェネティックな変化を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。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、DU145 細胞の切片担体培養の条件を基に、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築を目的とした。(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、この研究報告書では割愛させていただく。(3)について、ナノマテリアルの

細胞への影響について、細胞内動態と傷害機構について、病理学的及び分子生物学的に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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、ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析の研究方法について以下に示す。

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 γ -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 μ g/mL、10 μ g/mL、100 μ g/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、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。

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

3) 切片担体培養系の準備：

SD ラット(male, 21 week) 2匹をプロトコールに則り、麻酔下で安楽死させた。臓器(肺、肝臓など)を摘出し、Tissue-Tek cryomold(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)に OCT コンパウンド(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)を入れ、コンパウンド内に適当な大きさに切った組織を包埋した。組織を包埋した cryomold をドライアイス上で冷却した n-ヘキサン上に浮かべて OCT コンパウンドが固まるまで静置した。OCT コンパウンドが凍結し次第-80 °Cで保存した。凍結した組織を OCT コンパウンドでクライオスタット用のステージに貼り付けてセットしたのち、クライオスタット内(-20 °C~-30 °C)で組織を薄切した。切り出された切片は MAS コートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社, Osaka, Japan)へ貼り付けた。組織を貼り付けたスライドガラスをアセトンに浸漬し固定、あるいは固定せず風乾し、アセトン固定したものは風乾したのち-80 °Cで保存した。組織切片担体を 4 well multi dish(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)に入れたのち、乾燥材と共に密閉容器に収納して 4 °Cの暗所で一晩静置し、組織切片を乾燥させた。

4) 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°C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。

5) 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。曝露前後の細胞の Integrin- β 1 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。

ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

6) 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 μ l/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 μ l/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。

7) 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 社)を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った。6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well と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 μ M に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1ml に 10 μ M に調整した試薬を 200 μ L 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。

8) Flow cytometry による NPs の細胞内取り込みの確認 :

Flow cytometer (FCM)を用いて側方散乱光 (SSC) を測定することにより MNPs-Fe₃O₄ の細胞内取り込みの定量化を行った。

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が曝露 24 時間の場合は 1.5×10^5 cells/well、72 時間の場合は 8.0×10^4 cells/well となるように 6 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。

曝露 24 時間後または 72 時間後、まず培養液を除去し、PBS を用いてナノ粒子をウォッシュアウトした後、Trypsin/EDTA 200 μ L を用いて細胞を剥離して回収した。回収したすべての細胞を 1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清をアスピレータで吸引除去した。その後 PBS 2 mL に懸濁し、1000 rpm、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。その後、1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去してから PBS 600 μ L に懸濁し、InCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて SSC の測定およびデータの解析を行った。

9) AFM による DU145 細胞上の NPs 観察 :

ゼラチン粉末+純水で 1 mg/mL (0.1%)のゼラチン溶液を作製し、オートクレーブで 120 °C、10 分で溶解させた。35 mm dish にガラス基板を入れて 3 mlゼラチン溶液を入れて 60 分静置し、最終的にゼラチン溶液を除去し、クリーンベンチUV下で乾燥させた。AFM観察用に細胞を培養するためガラス基板にゼラチンをコートした。ゼラチンコート済のガラス基板に細胞を播種した。播種24時間後、細胞をカバーガラス上に接着させたまま固定(グルタルアルデヒド)した。固定した細胞をAFM装置 (プローブス

ーションSPI3800N (NanoNavi II Station)、SIIナノテクノロジー社;顕微鏡ユニット：SPA-400、SIIナノテクノロジー社) で測定し、写真撮影を行った。

10) 透過型電子顕微鏡(TEM)による観察：所定の条件で各細胞に Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 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)。

11) Apoptosis の解析：

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が曝露 24 時間の場合は 1.5×10^5 cells/well、72 時間の場合は 8.0×10^4 cells/well となるように 6 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。曝露 24 時間後または 72 時間後、まず培養液を 2000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、非接着細胞を回収した。また接着している細胞は、PBS を用いてナノ粒子をウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 200 μL を用いて細胞を剥離して ice-cold 培地で回収した。回収したすべての細胞を 2000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清をアスピレータで吸引除去した。その後 ice-cold PBS 2 mL に懸濁し、2000 rpm、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。その後 10 \times concentrated binding buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を DW (Distilled water) で 10 倍希釈した溶液 500 μL に細胞を懸濁した。ここに Propidium Iodide (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 2.5 μL と Annexin V-FITC solution (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 5 μl をそれぞれ加えて氷上・室温で 15 分間静置した。その後、InCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて測定およびデータの解析を行った。

12) NF- κB の発現量の測定：

細胞密度が 2.0×10^5 cells/well(24 時間曝露)、 0.8×10^5 cells/well(72 時間曝露)となるように細胞を 6 well plate に播種した。細胞接着後、

Fe_3O_4 NPs あるいは Fe_3O_4 NPs-COOH 曝露を行った。一定時間後、PBS を用いて NPs をウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 250 μL を添加して細胞を剥離し、回収した。回収した全ての細胞を 1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し上清を除去した後、PBS に懸濁した。15000 \times g、3 分の条件で遠心分離し、細胞をペレット状にした後上清を除去した。RIPA buffer 30 $\mu\text{L}/\text{sample}$ に protease inhibitor, phosphatase inhibitor を 0.3 $\mu\text{L}/\text{sample}$ ずつ混ぜ Mix を作り、各サンプルに 30 μL ずつ添加したあとホモジナイズした。4 $^\circ\text{C}$ 、15000 \times g、30 分の条件で遠心分離し、その上清を WB sample とした。Sample のタンパク質濃度を Brad ford 法によって測定し、全量 10 μL 、タンパク質量が 10 μg となるように sample と PBS を混合した。そこに同量の 2 \times SDS sample buffer(10% メルカプトエタノール含有)を加え計 20 μL とし、95 $^\circ\text{C}$ 、5 分の条件でタンパク質を変性させた。その後、E SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel electrophoresis)を行い、タンパク質を分離した。電気泳動を行ったゲルから PVDF membrane に分離したタンパク質を転写し、吸着させた。転写後、membrane を TBS-T buffer(2% BSA 含有)に 1 時間振盪させ、ブロッキングを行った。ブロッキング後、Signal Booster を用いて、一次抗体である β -actin 抗体(abcam)を 5000 倍希釈、NF- κB 抗体を 1000 倍希釈し、membrane を浸透させ、4 $^\circ\text{C}$ で一昼夜処理した。その後、TBS-T buffer に membrane を 10 分振盪し、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。

それぞれの抗体の動物種由来に対応する HRP 標識二次抗体を Signal Booster を用いて 10000 倍に希釈し、membrane を室温で 1 時間振盪した。その後、TBS-T buffer に membrane を 10 分振盪させ、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。洗浄後、発光試薬を membrane の表面に垂らし、5 分ほど反

応させ、検出器を用いて化学発光を検出し、バンドの検出を行った。各 Sample のバンドの定量化は Image J を用いて行った。

なお、抗癌剤 docetaxel (DTX) は前立腺癌細胞で NF- κ B の発現を誘導する事が知られているので、positive control として用いた。

13) Autophagy の確認 :

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が暴露 24 時間の場合は 8.0×10^3 cells/well、暴露 72 時間の場合は 3.0×10^3 cells/well となるように 96 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子暴露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。Positive control として、Tamoxifen (Cayman Chemical, Michigan, USA) 20 μ M で処理したサンプルも準備した。暴露 24 時間後および 72 時間後、まず plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離し、浮遊細胞を沈殿させ、上清を除去した。次に、MDC (Cayman Chemical, Michigan, USA) を Cell based assay buffer (Cayman Chemical, Michigan, USA) で 1000 倍希釈し、これを染色液として 100 μ L/well 加え、10 分間インキュベートした。その後、plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去してから Cell based assay buffer を 100 μ L/well 加え、さらに plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。最後に、上清を除去し、Cell based assay buffer を 100 μ L/well 加え、蛍光顕微鏡を用いて観察および撮影を行った。撮影した画像は、画像ソフトウェア Image J を用いて細胞数、画像の輝度と発光面積を求め、定量化を行った。

(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* 実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は当該施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従って行った。動物実験に関しても、当該施設の委員会に申請を行い、動物愛護法などを遵

守して行なった。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) に準じて行った。

C. 研究結果

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

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 1,2)。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 μ m で実験を行う事に決定した。Fe₃O₄NPs 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 3 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 4 に示す。スライドガラス上では曝露群 100 ± 20.2 %、100 μ 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。

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 5)。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。

ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

1) Fe₃O₄ NPs の DU145 細胞内の局在について:

細胞内に取り込まれた MNPs-Fe₃O₄ はエンドソームとみられる小胞内やミトコンドリアなどさまざまな細胞内小器官で観察された。また、多重膜を有する autophagosome とみられる小胞も確認された。表面修飾の有無で、局在が異なるのが確認された。特に非修飾の場合、細胞質での集積を顕著に認めた、修飾の場合は細胞内小器官への集積が認められた。

Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定では、MNPs-Fe₃O₄ の濃度依存的に SSC が増大し、細胞内への取り込み量が増大することが確認された。被修飾の場合、やや取り込み量が減少している傾向を認めた。

AFM での観察では、非修飾に比べてカルボキシル基修飾の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。細胞表面に付着している NPs 凝集体の粒径については、表面修飾の有無による違いは認められなかった。

2) 細胞生存率

前立腺癌細胞株において (図 6)、Fe₃O₄NPs および Fe₃O₄NPs-COOH の曝露量が増えるに従い、ともに細胞生存率は低下し、200 µg/mL 曝露時には有意に低下した (p<0.05)。しかし、Fe₃O₄NPs 曝露時に比べ、Fe₃O₄NPs-COOH 曝露時は細胞生存率の低下は抑制されるも両者の間に有意差は認めなかった。

3) ROS 生成の測定

細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を図 7 に示す。ROS の産生量を、Control 時を 1.00 [-] として数値化を行った。Fe₃O₄ NPs 曝露では、100 µg/mL 曝露時より有意に ROS 産生が確認された (p<0.05)。一方、Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露では、濃度に関係なく著大な上昇を認めなかった。

4) NF-κB の発現量の測定

Control 時 1.00 [-]、DTX 1 nM 処理時 1.89 [-]、Fe₃O₄NPs-COOH 100 µg/mL 曝露時 1.65 [-]、DTX 1nM と Fe₃O₄NPs-COOH 100 µg/mL 曝露時 1.29 [-]、Fe₃O₄NPs 100 µg/mL 曝露時 0.86 [-]、DTX 1nM と Fe₃O₄NPs 100 µg/mL 曝露時 0.80 [-] であった (図 8)。NF-κB の発現量の変化は、修飾により異なる挙動を認めた。

5) Apoptosis について

暴露 24 時間後においては、Control 3.73%、DTX 1 nM 処理時 4.96%、MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露時 4.72%、DTX 1nM と MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露時 5.74% であった。また、暴露 72 時間後においては、Control 5.41%、DTX 1 nM 処理時 9.12%、MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/ml 曝露時 7.37%、DTX 1nM と MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露

時 14.75%であった。

6) Autophagy について

ナノ粒子の修飾にかかわらず、濃度依存的及び時間依存的に autophagy を誘導し (図9)、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、細胞傷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(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が、統計学的有意差は認められなかった。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、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、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の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。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。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量に変化することを認めた。文献的には、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、in vitro 系での細胞傷害が報告されている。本研究での結果は、それと一致する。その機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。

磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)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異なる signal を介するも apoptosis や autophagy が関与する細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88, 2016.
- (2) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichiyaniagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn $_{1-x}$ Zn $_x$ Fe $_2$ O $_4$ nanoparticles for hypertension treatment. *J. Appl. Phys.*, 117, 17D157, 2015.
- (3) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 75(10), 1009-19, 2015.
- (4) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, Nano Based Drug Delivery, 2015, IAPC-OBP.
- (5) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡

- 邊昌俊.前立腺癌治療へのナノ粒子の応用.医学のあゆみ, 252(4), 303-8, 2015.
- (6) 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, 7098987, 2016.
- (7) 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.
- (8) 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. 259(3) 215, 2016.
- (9) 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. 259(3), 255-60, 2016.
- (10) 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.
- (11) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapy agents on prostate cancer cells in vitro. Appl. Sci., 8, 134, 2018.
- (12) 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.
- (1) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, heath security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (2) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (3) 渡邊昌俊, 中野洋, 白石泰三.各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について.第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (4) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N. Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (7) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、

2. 学会発表

- 2015年10月.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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 NFκB 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

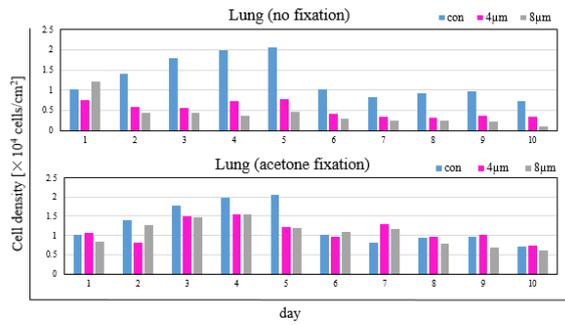


図 1. 肺組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

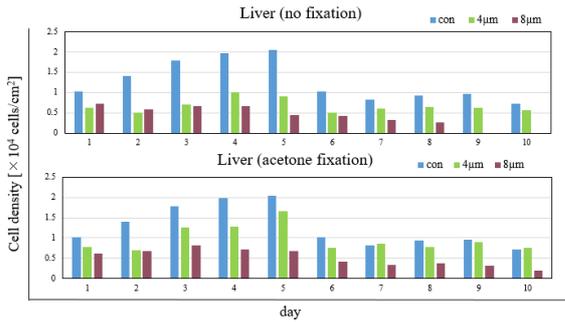


図 2. 肝組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

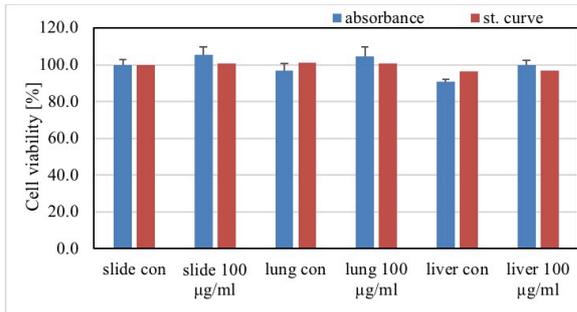


図 3. 磁性体ナノ粒子曝露による切片担体における細胞生存率

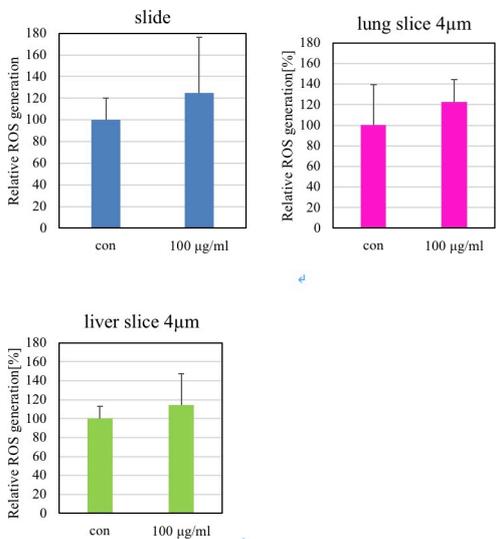


図 4. 組織切片担体上での A549 細胞の ROS 産生量

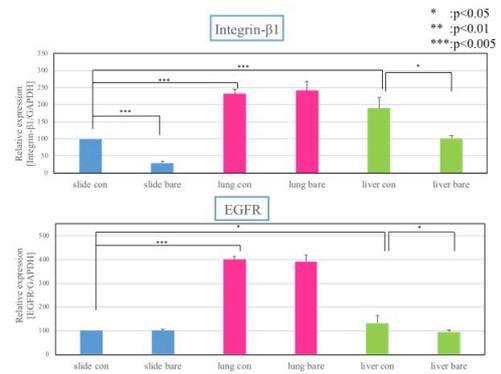


図 5. 切片担体と Integrin 及び EGFR 発現

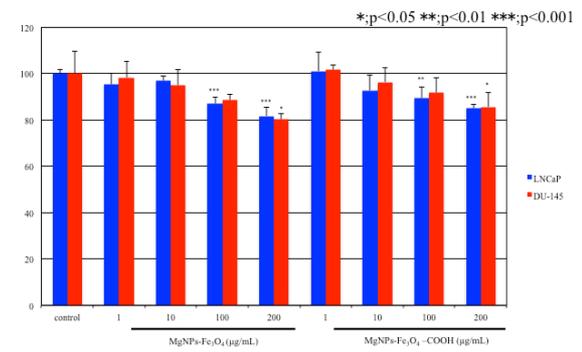


図 6. 磁性体ナノ粒子の表面修飾の有無と細胞生存率

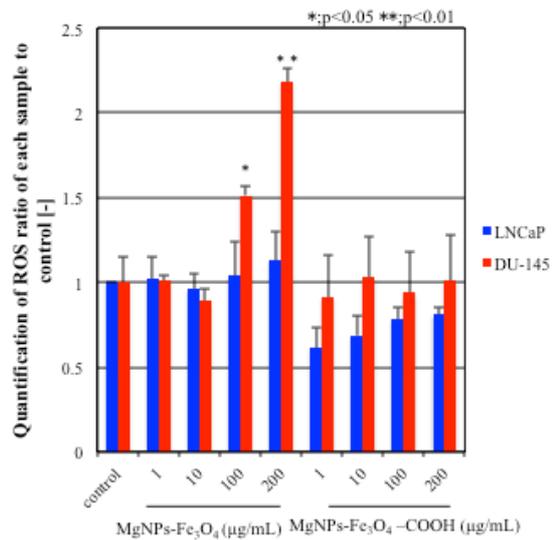


図 7. 磁性体ナノ粒子の表面修飾の有無と ROS 産生

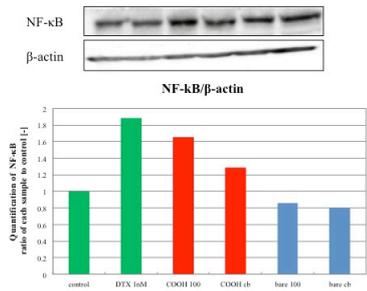


図 6. 磁性体ナノ粒子の表面修飾と NF-κB 発現量

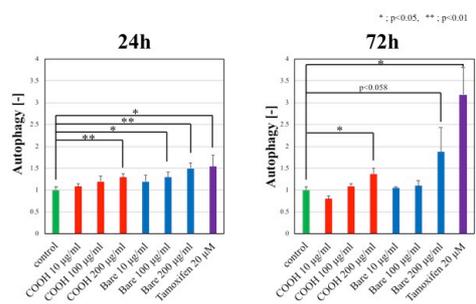


図 7. 磁性体ナノ粒子の表面修飾と Autophagy