

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

研究要旨：本研究では、磁性体ナノ粒子の表面修飾が肺上皮細胞の microRNA(miRNA)発現に及ぼす影響、およびナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響について調べた。

まず、非修飾磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)およびカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$)の肺上皮細胞A549への *in vitro* 曝露実験を行い、網羅的miRNA発現解析によりこれら非修飾およびカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子によって変動するmiRNAを抽出するとともに、クラスタリング解析から変動にともなう特徴的なmiRNA群を探索した。その結果、磁性体ナノ粒子の修飾の有無にかかわらず、miR-1260aおよびmiR-1260bの2つのmiRNAが特徴的な変動挙動を示すことが明らかとなった。これら2つのmiRNAの発現量は曝露後24時間で減少し、曝露後72時間では回復した。これらのmiRNAが細胞機能にどのような影響を及ぼしているかについては現在のところ不明である。また、クラスタリング解析から、miRNAの発現変動から、磁性体ナノ粒子においては曝露量よりもカルボキシ修飾の有無の方が細胞に及ぼす影響は大きいことが判明した。しかしながら、これら磁性ナノ粒子の影響よりも培養時間に伴うmiRNAの変動量の方が大きく、磁性ナノ粒子の細胞の生理機能に及ぼす影響はそれほど大きくないと考えられた。

カーボンナノチューブ(CNT)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、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

ナノテクノロジーの進歩により、ナノ物質 (nanomaterials) は様々な産業に利用され、ナノ物質を利用した製品の数は、この数年で急激に増加している。ナノ物質のサイズ、形状、表面積 (large surface area) や表面活性 (surface activity) は、ナノ物質を利用する上で魅力的な特性である反面、これらの性質は毒性にも寄与することが懸念される。ナノ物質は、呼吸や傷口等から容易に体内に侵入し、様々な組織に影響を及ぼすところが考えられる。しかしながら、ナノ物質に関する安全性に関しては、明確な基準は設けられていない。

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。本研究グループでの担当は、ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析である。

我々は先に、ヒト肺上皮細胞株 A549 においてナノ粒子の取り込みによって変動する遺伝子群の同定を DNA マイクロアレイによって解析した。その結果、細胞毒性の大きいナノ粒子は大きな遺伝子発現変動を誘導すること、それら変動する遺伝子群の多くは細胞周期の制御に関与していること、溶解により金属イオンの溶出をともなうナノ粒子では metallothioneins の大きな変動が観察されること、ナノ粒子の細胞毒性を低減する方法があることなどを明らかにした。近年、microRNA(miRNA)が様々な細胞機能に関与していることが示唆されている。miRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、遺伝子の転写後発現調節に関与する。ヒトゲノムには 1000~2000 の miRNA がコードされていると考えられている。miRNA はその標的 mRNA に結合し、

標的遺伝子の 3'UTR を認識して、翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。miRNA が様々な疾患に関与していることが明らかになるにつれて、疾患の新しいマーカー分子としての miRNA に期待が寄せられている。ナノマテリアルに暴露された細胞においても、miRNA の変動があれば、分子マーカーとなる可能性がある。本研究の第 1 の目的は、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)あるいはカーボンナノチューブ(CNT)をモデルマテリアルとして、肺上皮細胞株 A549 あるいは前立腺癌細胞株 DU145 でこれらナノマテリアルによって変動する miRNA 群の抽出とした。磁性体ナノ粒子によって発現が変動する miRNA 群を見出すことができれば、マーカー分子のみならず、磁性体ナノ粒子の生理機能への影響も推測できる可能性がある。

miRNA は様々な疾患に関与していることが報告されているが、特出した機能として遠隔細胞への情報伝達が挙げられる。遠隔細胞への情報伝達にはエクソソームが関与している。miRNA を含むエクソソームが細胞から分泌され、体液の移動とともに運ばれ、離れた細胞に取り込まれることにより遠隔細胞の生理的状態の制御を行っている。ナノ粒子がエクソソームに含有されたり、あるいはエクソソームの形成や放出、あるいはエクソソームに含有される miRNA の構成に影響を及ぼしているかどうかは現在のところ不明である。本研究の第 2 の目的はナノ粒子がエクソソームの形成に及ぼす影響を調べることを目的とした。

B. 研究方法

B1. ナノマテリアルの調整

非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOH)は横浜国立

大学工学部渡邊研究室から得た。調製法等について研究代表者の年次報告書を参照のこと。また、CNT は分担研究者である戸塚ユニット長（国立がん研究センター研究所）より供与された。

B2. ナノマテリアル による曝露実験

ヒト肺上皮細胞株 A549 を非修飾磁性ナノ粒子あるいはカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後に全 RNA を抽出した。A549 の磁性体ナノ粒子による曝露濃度は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。培養条件および曝露方法は研究代表者の年次報告書に詳しい。曝露細胞から得た RNA サンプルは、以下のようにサンプル名を付した。

C-24h：磁性体ナノ粒子で曝露せずに 24 時間培養した細胞。

NM100-24h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

NM200-24h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

M100-24h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

M200-24h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

C-72h：磁性体ナノ粒子で曝露せずに 72 時間培養した細胞。

NM200-72h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 72 時間曝露した細胞。

M200-72h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 72 時間曝露した細胞。

DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ(CNT)を 24 時間曝露し、細胞から RNA を抽出した。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

DU145 L200: DU145 細胞に CNT(Long)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

DU145 S200: DU145 細胞に CNT(Short)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 L200: A549 細胞に CNT(Long)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

B3. miRNA マイクロアレイ

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。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。

B4. リン酸カルシウム粒子の調整

180mL の 11mM CaCl_2 溶液 (pH = 9) を 20mL の 66mM Na_2HPO_4 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 $\times\text{g}$ 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。

B5. リン酸カルシウムによる曝露実験

RAW264.7 および THP-1 細胞を、 5×10^4 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 1000 μ g/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。

B6. カルシウム濃度の測定

収集したエクソソーム (1×10^6 個のエクソソーム) または細胞 (3×10^5 個の細胞) に 70% HNO₃ 3500 μ L、37% HCl 200 μ L および 30% H₂O₂ 100 μ L 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. 研究結果と考察

C1. 磁性体ナノ粒子による miRNA 発現の変動

磁性体ナノ粒子による A549 の miRNA の変動に関する研究は本プロジェクトの研究期間である3年間にわたって行ったが、磁性体ナノ粒子の曝露に対する影響よりも播種した細胞の初期状態や培養時間の経過に伴う発現変動の方が大きく、データの詳細な信頼性に関する保証が得られなかった。しかしながら、図1に示すクラスタリングの傾向から、磁性体ナノ粒子が miRNA 発現に及ぼす影響として、磁性体ナノ粒子の修

飾の有無の方が、曝露濃度よりも影響が大きいことはほぼ間違いないと思われる。細胞毒性の結果も、非修飾磁性体ナノ粒子の細胞毒性の方がカルボキシ修飾した磁性体ナノ粒子よりも毒性が大きいことが示されている。曝露濃度は 100 μ g/ml および 200 μ g/ml であったが、これらの濃度では細胞内に取り込まれる量の限界値を超えていると思われる。いずれの濃度であっても細胞内の粒子濃度は同じであると考えられ、そのために miRNA の発現パターンの相違が小さかった可能性がある。図 1a に示したヒートマップから特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した (図 1a)。Cluster-1 は、has-miR-1274_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している (図 2, 表 1)。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている (図 2, 表 2)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている (図 2, 表 3)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時

間暴露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった (図 2, 表 4)。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

ここで得られた特徴的な発現パターンを示した cluster 1、2、3 および 4 の 21 個の miRNA について、異なる培養において再現性の実験を数度行った結果、miR-1260a および miR-1260b に関しては比較的再現性が高いことが判明した。miR-1260b 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、1 回目の実験において、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、2 回目の実験では、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。1 回目と 2 回目では、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。

miR-1260b の機能に関しては、SFRP1、DKK2、および SMAD4 が miR-1260b の標的遺伝子であり、癌細胞の増殖と浸潤に関与している可能性があることが報告されている。また、miR-1260b の発現が、正常な腎臓組織と比較して腎臓癌組織において亢進しており、そして発現の上昇が患者の生存率に有意に関連していることが指摘されている。さらに、この miRNA が非小細胞

性肺癌のリンパ節への転移に関与する可能性も報告されている。本研究に用いられた細胞が肺癌由来の A549 であることを考えると、磁性体ナノ粒子が miR-1260b の発現のトリガーになることも考えられるが、正常な細胞でもの miRNA が発現するのかどうかは今後の検討が必要である。一方、miR-1260a の細胞機能への影響に関する情報を見出すことはできなかった。

C2. カーボンナノチューブによる 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 3 に示す。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 5 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。

C3. 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 4A)、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 4B)。

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 5A)。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 5B)。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 5C)。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 5D)。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 6A、B)。すなわち、リン酸カルシウム粒子もリン酸カルシウム住む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 6C)、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。

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。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) N. Hanagata, H. Morita. Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles. *J. Toxicol. Sci.* 40(5), 625-35, 2015.

- (2) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R.A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.* 10, 6105-19, 2015.
- (3) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata, Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery, *Mater. Express*, 6, 116-26, 2016
- (4) 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.*, 7, 2392-402, 2017.
- (5) 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*, 33, 591-9, 2017.
- (6) 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.*, 8, 13936, 2017.

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.

E. 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

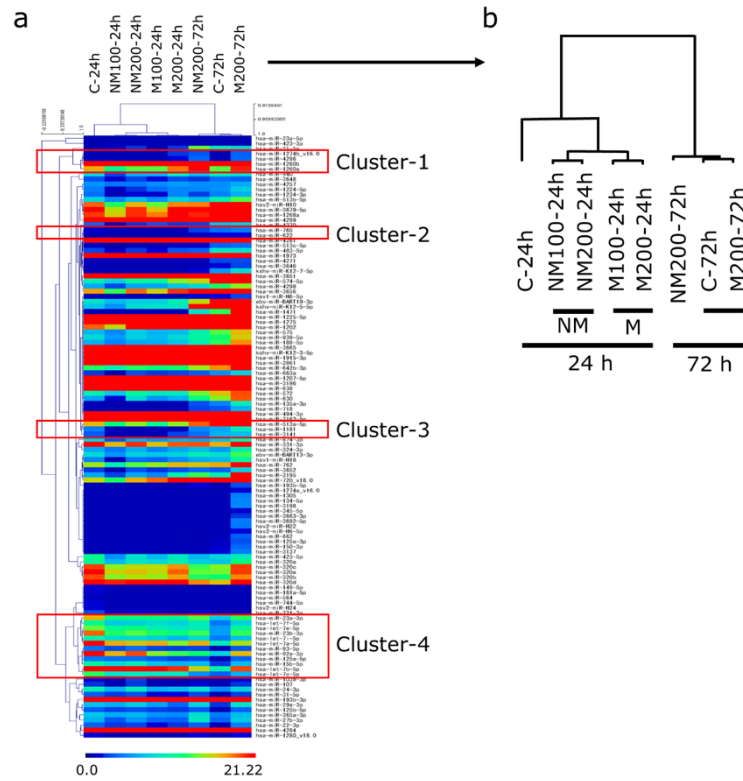


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリーとヒートマップ

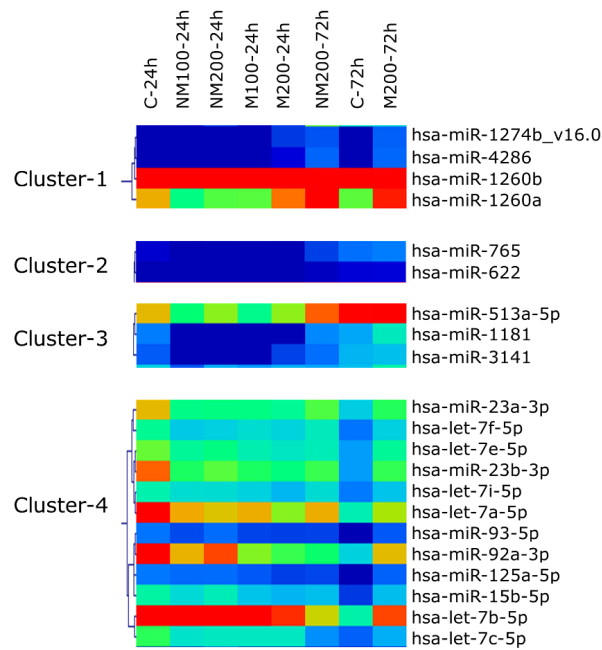


図 2. 各クラスターのヒートマップとクラスターを構成する miRNA

表 1. Cluster-1 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

| Systematic Name | Normalized signal intensity (linear scale) | | | | | | | |
|---------------------|--|----------------|----------------|--------------|--------------|-------|----------------|--------------|
| | C-24h | NM100- -24h | NM200- -24h | M100- 24h | M200- 24h | C-72h | NM200- -72h | M200- 72h |
| hsa-miR-1274b_v16.0 | ND | ND | ND | ND | 2.4 | ND | 3.3 | 3.7 |
| hsa-miR-4286 | ND | ND | ND | ND | 2.2 | ND | 3.9 | 4.0 |
| hsa-miR-1260b | 31.3 | 24.9 | 33.2 | 30.5 | 42.8 | 31.7 | 57.1 | 51.8 |
| hsa-miR-1260a | 17.1 | 11.7 | 13.6 | 13.7 | 18.5 | 13.7 | 21.2 | 20.3 |

ND, not detected

表 2. Cluster-2 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

| Systematic Name | Normalized signal intensity (linear scale) | | | | | | | |
|-----------------|--|---------------|---------------|--------------|--------------|-------|---------------|--------------|
| | C-24h | NM100- 24h | NM200- 24h | M100- 24h | M200- 24h | C-72h | NM200- 72h | M200- 72h |
| hsa-miR-765 | 1.8 | ND | ND | ND | ND | 4.2 | 2.6 | 4.7 |
| hsa-miR-622 | ND | ND | ND | ND | ND | 2.1 | 1.4 | 2.1 |

ND, not detected

表 3. Cluster-3 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

| Systematic Name | Normalized signal intensity (linear scale) | | | | | | | |
|-----------------|--|---------------|---------------|--------------|--------------|-------|---------------|--------------|
| | C-24h | NM100- 24h | NM200- 24h | M100- 24h | M200- 24h | C-72h | NM200- 72h | M200- 72h |
| hsa-miR-513a-5p | 16.7 | 12.1 | 14.6 | 11.4 | 14.7 | 20.7 | 18.9 | 26.9 |
| hsa-miR-1181 | 4.7 | ND | ND | ND | ND | 6.3 | 5.1 | 9.7 |
| hsa-miR-3141 | 3.5 | ND | ND | ND | 2.7 | 6.8 | 4.2 | 7.3 |

ND, not detected

表 4. Cluster-4 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度 (発現量)

| Systematic Name | Normalized signal intensity (linear scale) | | | | | | | |
|-----------------|--|---------------|---------------|--------------|--------------|-------|---------------|--------------|
| | C-24h | NM100 -24h | NM200 -24h | M100- 24h | M200- 24h | C-72h | NM200 -72h | M200- 72h |
| hsa-miR-23a-3p | 16.7 | 11.6 | 11.8 | 11.7 | 11.1 | 8.0 | 13.5 | 12.9 |
| hsa-let-7f-5p | 11.2 | 7.8 | 8.1 | 8.9 | 8.3 | 4.4 | 9.8 | 8.2 |
| hsa-let-7e-5p | 13.9 | 11.1 | 11.7 | 10.2 | 9.4 | 5.9 | 9.9 | 11.0 |
| hsa-miR-23b-3p | 18.8 | 12.7 | 13.7 | 12.7 | 11.9 | 5.8 | 13.2 | 13.1 |
| hsa-let-7i-5p | 10.2 | 8.8 | 8.7 | 8.2 | 7.0 | 4.6 | 8.8 | 7.5 |
| hsa-let-7a-5p | 21.8 | 17.2 | 16.5 | 17.1 | 14.5 | 10.0 | 17.1 | 15.2 |
| hsa-miR-93-5p | 4.4 | 3.0 | 4.1 | 2.7 | 2.6 | ND | 2.7 | 3.4 |
| hsa-miR-92a-3p | 21.2 | 16.9 | 19.4 | 14.4 | 13.2 | 8.2 | 12.5 | 16.7 |
| hsa-miR-125a-5p | 4.6 | 4.1 | 4.1 | 3.5 | 2.7 | ND | 2.8 | 3.8 |
| hsa-miR-15b-5p | 10.7 | 8.6 | 9.9 | 7.5 | 6.9 | 2.4 | 7.3 | 7.2 |
| hsa-let-7b-5p | 28.0 | 21.9 | 21.0 | 21.8 | 19.9 | 10.4 | 16.0 | 19.5 |
| hsa-let-7c-5p | 12.9 | 9.2 | 9.6 | 9.5 | 9.5 | 3.7 | 5.4 | 6.6 |

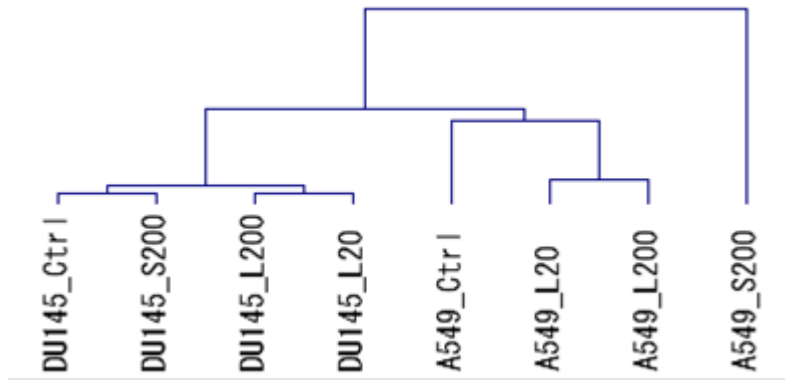


図 3. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー

表 5. 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 | --- | | |

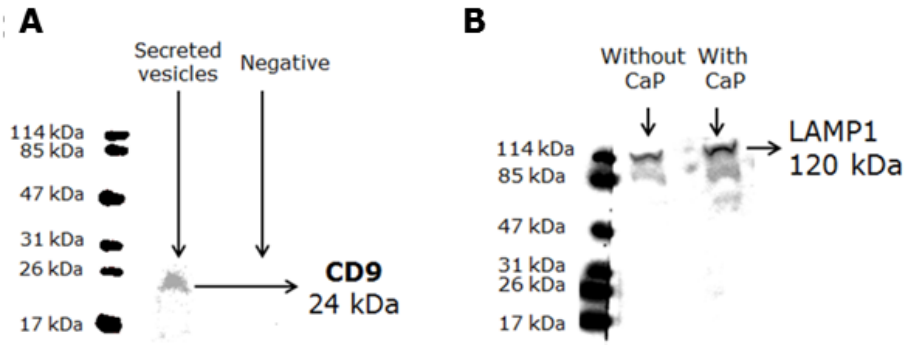


図4. ウェスタンブロット A.リン酸カルシウム粒子（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で処理したRAW264.7細胞から分泌されたエキソソーム中のCD9の発現。ネガティブ、ミディアムだけ。B.リン酸カルシウム粒子（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）または未処理のRAW264.7細胞から分泌されたエキソソーム中のLAMP-1の発現。

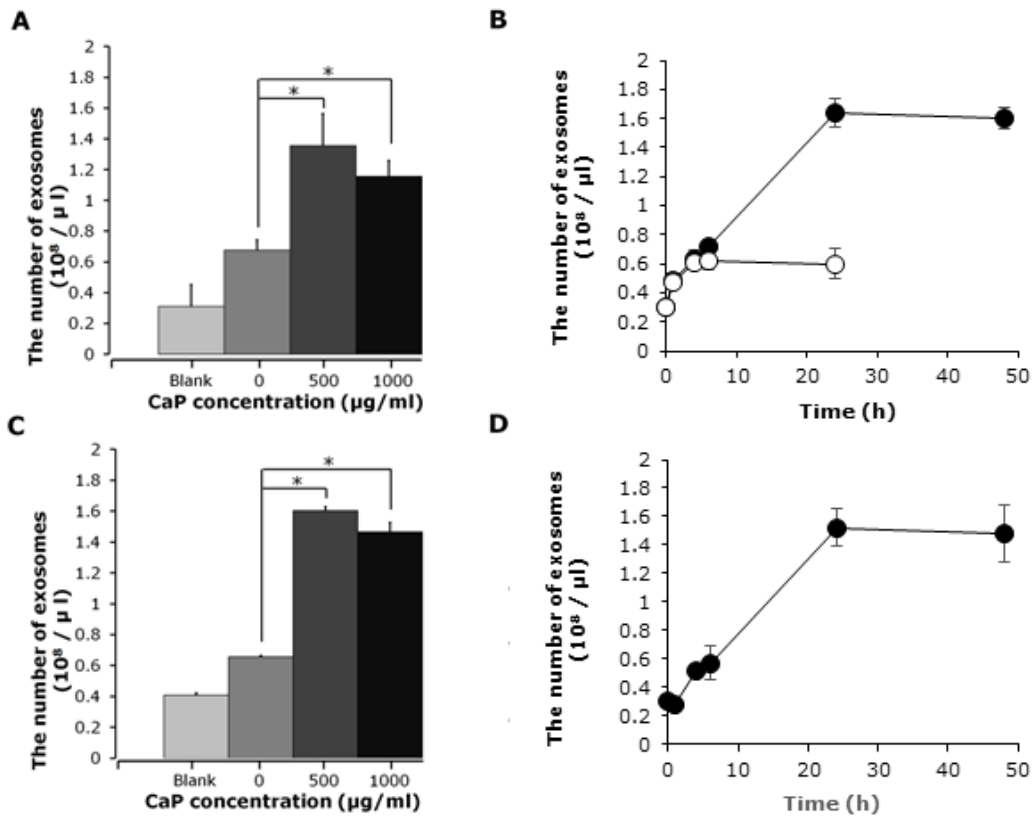


図5. エキソソームの分泌 A. 72時間の培養後にRAW264.7細胞から分泌されたエキソソームの数。空白、培地のみ。B.500 $\mu\text{g}/\text{L}$ のリン酸カルシウム粒子で処理（黒丸）および非処理（白丸）のRAW264.7細胞からのエキソソーム分泌の時間経過。C. 72時間の培養後にTHP-1細胞から分泌されたエキソソームの数。B.500 $\mu\text{g}/\text{L}$ のリン酸カルシウム粒子で処理したTHP-1細胞からのエキソソーム分泌の時間経過。

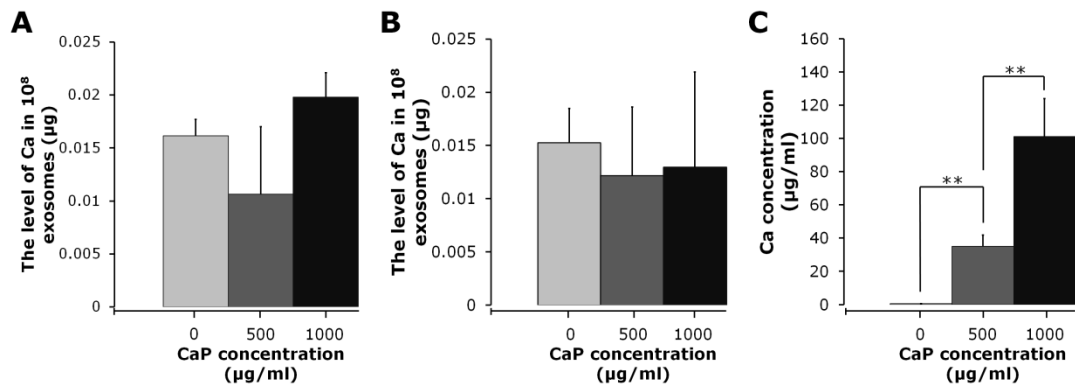


図 6. エキソソームおよび細胞におけるカルシウム含量 A.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/mL で処理した RAW264.7 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. B.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/mL で処理した THP-1 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. C. 0、500、および 1000µg/mL のリン酸カルシウム粒子で 72 時間処理した RAW264.7 細胞のカルシウムの量.