

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
in vitro 評価系の高度化

研究分担者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：本研究は、A549 細胞等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/MNPs)の細胞傷害機構の解明を目的とした。まず、A549 細胞の切片担体培養系を利用して、磁性体ナノ粒子の曝露実験を行い、切片担体培養系の特性を評価した。A549 細胞における Integrin β -1 および EGFR の発現が通常の 2 次元培養より切片担体上で有意差を持って発現量が上昇し、また、切片担体上の A549 細胞は磁性体ナノ粒子の取り込みの減少が認められた。これらの結果より、一般的に *in vitro* 毒性評価系に用いられる 2 次元単細胞培養系とは異なる切片担体と細胞との相互関係が新たに構築され、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境の再現系の一つである可能性が考えられた。

細胞における磁性体ナノ粒子の細胞傷害機構を microRNA 発現の観点から明らかにするために、A549 細胞に磁性体ナノ粒子を曝露し、microarray を用いて、microRNA の網羅的発現解析を行った。磁性体ナノ粒子により発現が誘導された microRNA 群より miR5787 を抽出し、さらなる発現解析および標的遺伝子の解明を行った。miR5787 は濃度依存的に誘導され、活性酸素種(ROS)による誘導であることを明らかにした。さらに、この miR5787 の標的遺伝子が eIF5 である可能性を見出した。磁性体ナノ粒子による microRNA の発現誘導という epigenetics への影響が細胞傷害機構に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい *in vitro* 評価系として考えられる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/MNPs)の細胞傷害機構の解明である。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、およびその細胞傷害機構の解明を報告してきた。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) 磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明およびエピジェネティクス

マーカーの検索である。(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の共同研究のデータをもとに、さらなる解析を行った。

B. 研究方法

切片担体培養系を用いたナノマテリアルの毒性評価系の構築、ナノマテリアルの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、ヒト肺上皮細胞由来細胞株 A549 を使用した。細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。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/MNPs) :

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。

磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs/MNPs)は戸田工業株式会社および Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。所定の濃度に培養液で調整して、超音波破碎機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社) にて、分散処理を行い、磁性体ナノ粒子の凝集を取り除き使用した。細胞への磁性体ナノ粒子の曝露前には、培養液中における大きさ、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) で測定を行った。

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。これらの過程は、戸塚分担研究者が所属する国立がん研究センターの動物実験の機関承認を受け、国立がん研究センター研究所で行われた。

4) 切片担体培養 :

組織切片担体 (肺および肝臓) を 4 well multi dish (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 7x10⁴ cells/well 播種、培養をした。

5) 切片担体培養系による A549 細胞の毒性関連評価 :

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、組織切片担体上の A549 細胞の磁性体ナノ粒子取り込みを 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(Epidermal growth factor receptor, EGFR)の発現を、プロトコールに従い RNA 抽出、cDNA 合成後リアルタイム PCR (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Labo., Hercules, California, USA) で解析をした。所定の条件で、Integrin β 1(5'-CAAAGGAACAGCAGAGAAGC-3', 5'-ATTGAGTAAGACAGGTCCATAAGG-3')、EGFR (5'-CTATAGGATGGAGGAGACG-3', 5'-CAGAGGAGGAGTATGTGT

GA-3')、GAPDH (5'-AGGTGAAGGTCG GAGTCA-3', 5'-GGTCATTGATGGCAACAA-3')のプライマーを利用した。

ナノマテリアルの傷害機構の解析

6) 網羅的 microRNA 発現解析:

国立研究開発法人物質・材料研究機構の花方分担研究者により、microRNA 網羅的解析は、SurePrint G3 Human v16 miRNA 8x60K microarray kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行われた。

7) 候補 microRNA 発現解析

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 1.0×10^5 cells/well、48時間の場合は 8.0×10^4 cells/well、72時間の場合は 6.0×10^4 cells/well となるように6 well plateに播種した。細胞接着後、各ナノ粒子をControl (0 $\mu\text{g/mL}$)、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度で曝露した。曝露24、48、72時間後に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 μL 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て細胞を洗浄した。続いて、上清を吸引除去し、再度PBS 1 mLに懸濁し、1.5 mLチューブへ移した。さらに、15000 \times g、3分の条件で遠心分離を行い、上清を吸引除去し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、これを回収操作とした。

次に、miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland) を用いてプロトコルに従って total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA はキットおよびプロトコルに従い、cDNA を合成した。合成した cDNA の濃度を測定し、cDNA 濃度が 4000 ng/mL となるように DEPC 水を加えて 20 μL に希釈した。それぞれのサンプル 1 μL と、ハウスキーピングとして用いる GAPDH を測定する際は濃度 Primer F/R それぞれ 0.24 μL 、THUNDER BIRDTM SYBER[®]qPCR Mix 10 μL

(TOYOBO, Osaka, Japan)、蒸留水 (DW) 8.52 μL を測定用 96 well プレートに入れ、miRNA を定量したいサンプルに関しては、それぞれのサンプル 1 μL と、特定の miRNA を定量化する各 miRNA 特有の TaqMan[®]MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 0.8 μL 、Sso Advanced[™] Universal Probes Supermix (BIORAD, California, USA) 10 μL 、DEPC 水 8.2 μL を測定用 96 well プレートに入れ、GAPDH はインターカレーター法で、miRNA は TaqMan プローブ法で、CFX Connect[™] Real-Time System (BIORAD, California, USA) を用いて 95 $^{\circ}\text{C}$ 10分加熱後、95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒、60 $^{\circ}\text{C}$ で1分加温しそれを55サイクル繰り返した。定量化は、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて行った。miRNA Microarray 解析結果より、細胞種に関わらず発現が大きく上昇した miR5787 を標的とした。

7) eIF5 の発現解析:

miR5787 が線維芽細胞の細胞増殖や成長に参与する eukaryotic translation Initiation Factor 5 (eIF5) の発現を抑制するという報告 [BBRC, 415, 567-72, 2011]があることから、磁性体ナノ粒子曝露後の A549 細胞における eIF5 の mRNA 発現量・タンパク量を解析した。

回収したサンプルに RIPA Buffer (ATTO, New York, USA) を 30 μL 、Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 0.3 μL を加え、ホモジナイザーペッスル (AS ONE, Osaka, Japan) を用いて細胞塊が見えなくなるまでホモジナイズした後、15000 \times g 30分 で遠心した。上清を回収し、サンプルとした。保存は-20 $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。調製したサンプルを Bradford 法により濃度を測定した。20 μg にタンパク量を調製したサンプル 10 μL に 2 \times sample buffer を 10 μL 加え、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱した。sample buffer は 2 \times Laemmli Sample Buffer (BIORAD, California,

USA) を 950 μ L の 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 50 μ L で調製した。1 \times Running buffer を泳動槽 (ATTO, NewYork, USA) に入れ、ウェルを洗浄後、サンプルを 20 μ L アプライし AE-6531 パジエラン (ATTO, NewYork, USA) を用いて 80 分間泳動した。Instruction Manual 記載のプロテイング用溶液を 3 種 (A,B,C) 調製した (下記参照)。A 液に 2 枚, B 液に 1 枚, C 液に 3 枚のろ紙 (85 \times 90 mm) (ATTO, NewYork, USA) を浸した。メンブレン(85 \times 90 mm) (ATTO, NewYork, USA) を methanol に 20-30 秒間浸し、B 液に入れ 30 分以上振とうした。泳動終了後、Manual 記載の順にろ紙、メンブレン、ゲルを重ね、AE-6685 パワープロット・ミニ (ATTO, NewYork, USA) を用いて 60 分で転写した。転写終了後、AE-1477 EzBlock CAS (ATTO, NewYork, USA) (リン酸化の場合は AE-1475 EzBlock Chemi (ATTO, NewYork, USA)) にメンブレンを浸し、60 分間振とうした。ブロッキング終了後、メンブレンを洗浄し、各希釈率で希釈した一次抗体に、4 $^{\circ}$ C、一晩で振とうした。一次抗体の希釈は Signal Booster A (Beacle, Kyoto, Japan) で行った。一次抗体反応終了後、TBS-T で 10 分洗浄を 3 回行い、一次抗体と同様に二次抗体反応を常温で 60 分間行った。二次抗体の希釈は Signal Booster B (Beacle, Kyoto, Japan) で行った。二次抗体反応終了後、TBS-T で 10 分洗浄を 3 回行い、ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Illinois, USA) の試薬を調製しメンブレンに添加、5 分反応させた。メンブレンをスリーブにはさみ込み Light-Capture (ATTO, NewYork, USA) で検出した。得られたバンドの結果を Image J を用いて輝度を算出し、解析を行った。一次抗体として、eIF5 (#2480, CST, Danvers, Massachusetts, USA) および β -actin (ab6276, Abcam, Cambridge, UK)、二次抗体 (#934&931, GE

Healthcare, Illinois, USA)を用いた。

(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、国立がん研究センター研究所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

各培養担体上における SS を縦軸としたヒストグラムを Fig. 1 に示す。磁性体ナノ粒子非曝露群に比べて 100 μ g/mL 曝露群の SS (Side Scatter、側方散乱光) が増加していることが、各培養担体上で確認された。磁性体ナノ粒子曝露時の各担体上における SS 変化を、非曝露群を 1 として定量化した結果を Fig. 2 に示す。SS 増加は、二次元培養曝露群が $1.71 \pm 4.49 \times 10^{-2}$ 、肺切片担体上曝露群が $1.43 \pm 4.93 \times 10^{-2}$ 、肝臓切片上曝露群が 1.44 ± 0.122 であった。各組織切片の SS 増加量は、二次元培養と比較し有意な差を持って減少した。

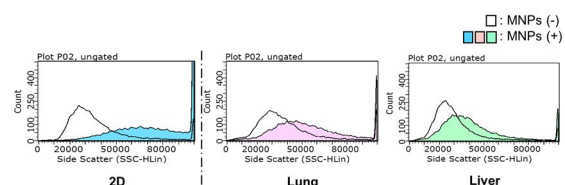


Fig.1 SS ヒストグラムの比較

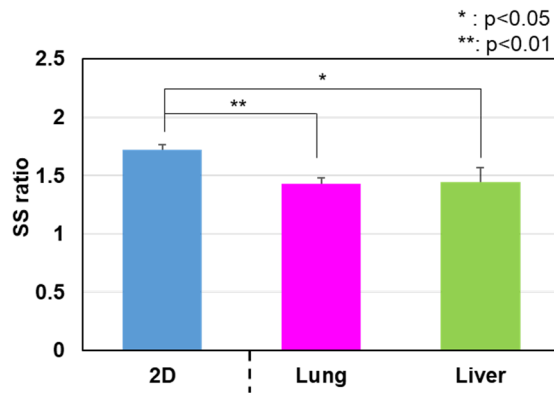


Fig.2 磁性体ナノ粒子 100 μ mL 曝露時の SS 変化量

各組織切片担体における Integrin- β 1 及び EGFR (Epidermal growth factor receptor) の mRNA 発現量を Fig. 3 および 4 に示す。磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露した。各遺伝子で、従来の二次元培養での非曝露群の発現量を 1 として相対的に定量化した。Integrin- β 1 の発現量は、二次元培養上 100 μ mL 曝露時は 0.228 ± 0.109 、肺切片担体上では非曝露時 2.93 ± 0.721 、100 μ mL 曝露時は 2.23 ± 0.415 、肝臓切片担体上では非曝露時は 2.01 ± 0.572 、100 μ mL 曝露時は 1.43 ± 0.436 であった。EGFR の発現量は、二次元培養上 100 μ mL 曝露時は 1.15 ± 0.514 、肺切片担体上では非曝露時は 4.11 ± 0.676 、100 μ mL 曝露時は 3.91 ± 0.994 、肝臓切片担体上では非曝露時は 1.33 ± 0.122 、100 μ mL 曝露時は 1.39 ± 0.711 であった。Integrin- β 1 の発現は、二次元培養における非曝露群と比較して、二次元培養の磁性体ナノ粒子 100 μ mL 曝露時に有意に減少、肺切片担体上の非曝露時と肝臓切片担体上の非曝露時で有意に増加したが、曝露時ではやや減少を認めた。EGFR の発現は、二次元培養における非曝露群と比較して、肺切片担体上の非曝露時と肝臓切片担体上の非曝露時で有意に増加し、曝露時ではやや減少を認めた。

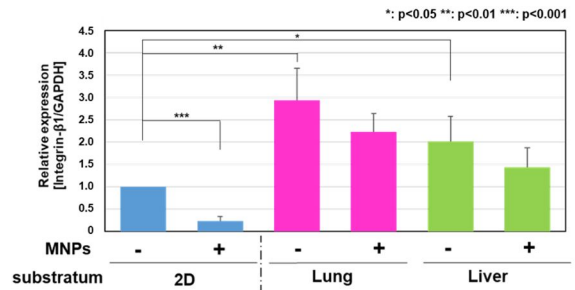


Fig.3 Integrin- β 1 の発現量

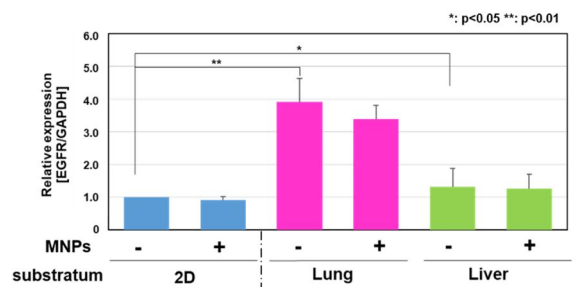


Fig.4 EGFR の発現量

ナノマテリアルの傷害機構の解析

候補 microRNA 発現解析: 100~400 μ mL の磁性体ナノ粒子を曝露後 24~72 時間における miR5787 の発現を Real-Time PCR で解析を行った (Fig.5)。濃度依存的に発現量は増加し、72 時間後まで発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種 (ROS) 発生を抑制すると、miR5787 の発現量が抑制されるのを認めた。

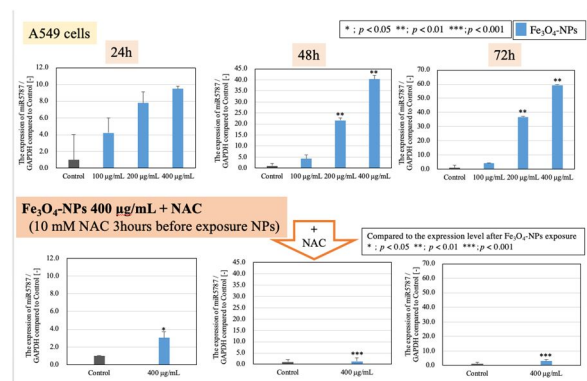


Fig.5 磁性体ナノ粒子曝露による miR5787 発現量変化

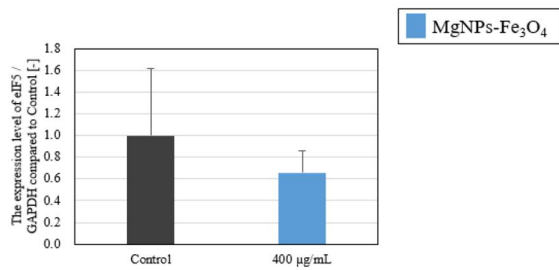


Fig.6 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 mRNA 発現

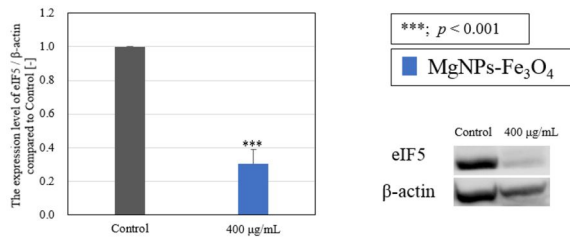


Fig.7 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 蛋白発現

miR5787 の標的遺伝子と考えられる eIF5 の発現を mRNA および蛋白レベルで解析した。磁性体ナノ粒子暴露により、いずれも発現量が減少するのを認めた。

D. まとめ

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子の曝露実験を行った。Flowcytometry による SS 値の測定より、細胞内の磁性体ナノ粒子の取込み量を定量化した。SS の上昇は磁性体ナノ粒子によるものと考えナノ粒子の取込み指標とした。切片担体培養系を用いた A549 の磁性体ナノ粒子の取込みは、従来法の培養細胞のナノ粒子取込みに比べ有意に低下することが示された。加えて、細胞-細胞外マトリックス間の接着に關与する Integrin-β1 や細胞表面に発現する EGFR の発現解析より、二次元培養では Integrin- 1 は磁性体ナノ粒子により発現が減少することを認めた。一方、切片担体培養系では Integrin-β1 の発現が有意に亢進した。またナノ粒子を曝露した状態でも、二次元培養と比較して Integrin-β1 の発現が維持されるのを確認した。EGFR の発現量は、肺切片担体上での発現が高い傾

向が認められた。Integrin-β1 や EGFR は細胞の物質取込み経路に係わることが報告されている[EMBO J, 33(18), 2098-2112, 2014]。細胞の物質取込み経路の一つであるエンドサイトーシスは複数のシステムにより進行するが、そのうちの一つにクラスリン介在性エンドサイトーシスがある。このエンドサイトーシスは切断タンパク質 Dynamin 2 が小胞の切断を行うが、切断には Girdin という制御因子と相互作用を起こす必要がある。しかし、Girdin は Integrin-β1 あるいは EGFR の存在下ではこの二因子と結合し、Dynamin 2 とは相互作用を起こすことができなくなり、結果としてエンドサイトーシスによる物質の取込みが抑制される。

以上より、通常の *in vitro* 培養系とは異なる切片担体培養系は細胞外マトリックスを含む組織の微小環境を培養細胞に提供することで、細胞-組織間の接着を担う接着因子や表面に発現する増殖因子受容体を制御し、生体内での環境を模している可能性があると考えられた。

磁性体ナノ粒子の曝露により、miR5787 の発現上昇、その標的遺伝子である eIF5 の発現減少が認められた。また、miR5787 は ROS を減少させると発現量が減少することを認めた。磁性体ナノ粒子による ROS 産生が miR5787 発現を誘導するという経路が想定された。今後、miRNA5787 の抑制による eIF5 の発現制御および eIF5 の機能、特に細胞傷害への関与について解析する必要がある。

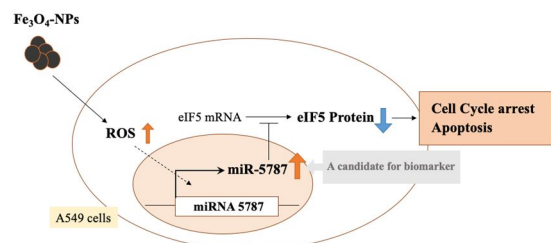


Fig.8 まとめ

E . 研究発表

1. 論文発表

- (1) E.Fukai, H.Sato, M.Watanabe, D.Nakae, Y.Tostuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 109(4), 1024-1031, 2018.
- (2) K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, M.Watanabe. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J. Clin. Med.* 7, 68, 2018.
- (3) G.W.Lee, J.B.Park, S.Y.Park, J.Seo, S.H.Shin, J.W.Park, S.J.Kim, M.Watanabe, Y.S.Chun. The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src. *Oncogene*, 37, 5552-68, 2018
- (4) Y.Fujiwara, M.Nishida, M.Saito, A.I Robles, F.Takeshita, M.Watanabe, T.Ochiya, J.Yokota, T.Kohno, C.C.Harris, N.Tsuchiya. A nucleolar stress-specific p53-miR-101 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network. *EBioMedicine*, 33, 33-48, 2018.
- (5) Y.Kudo, Y.Sasaki, T.Onodera, J.Hashimoto, T.Nozaki, K.Tamura, M.Watanabe, M.Masutani. Measurement of poly(ADP-ribose) level with enhanced slot blot assay with crosslinking. *Challenges*, 9(2), 27, 2018.
- (6) K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4(8), 2729-2732, 2018.
- (7) Y.Nishimura, K.Kasahara, T.Shiromizu, M.Watanabe, M.Inagaki. Primary cilia as

signaling hubs in health and disease. *Adv. Sci.*, 1801138, 2018.

2. 学会発表

- (1) K.Kojima, S.Takahashi, S.Saito, T.Nittami, E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, M.Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel via ROS generation and NF-KB signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (2) S.Takahashi, S.Saito, T.Nittami, Y.Totsuka, Y.Nakagawa, M.Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after Fe₃O₄ nanoparticles exposure (II). 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (3) S.Saito, S.Takahashi, T.Nittami, Y.Totsuka, Y.Nakagawa, M.Watanabe. Establishment of the substrate made of tissue/ organ sections for histopathology based systems for nanotoxicity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (4) Y-S.Chun, J.B.Park, G.Lee, S.Y.Park, M.Watanabe. Activation of c-Src by neddylation blockade enhanced cancer cell migration through Akt signaling pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (5) K.Ishii, S.Kajiwara, K.Iguchi, M.Kato, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Characterization of human prostate cancer LNCaP sublines differing in androgen-sensitivity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (6) M.Kato, K.Ishii, S.Kajiwara, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Fibroblasts disturb the expression of cancer-related genes in non-transformed human

prostatic epithelial cell line BPH-1. 第 77 回日本癌学会学術総会，大阪国際会議場，2018 年 9 月.

- (7) K.Ishii, I.Matsuoka, T.Sasaki, M.Kato, K.Nishikawa, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Iguchi, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (8) M.Watanabe, S.Takahashi, E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa. Crosstalk between apoptosis and autophagy induced by docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface in prostate cancer cells. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.

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