

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
分担研究課題名：***in vitro*** 評価系の高度化と有害性発現経路の確立

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：本分担研究では、①ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験、文献などのデータによる AOP の確立を目標とした。①に関して、ヒト 3D 皮膚再構成系による金属ナノマテリアルの一般毒性評価系の確立し、共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝性毒性評価の構築のために共通して使用する二酸化チタンの評価を行った。水に不溶性である二酸化チタンナノ粒子の取り扱い方法の改善とその細胞毒性の評価を行った。②に関して、microRNA の挙動は活性酸素種(ROS)依存性、活性酸素種(ROS)非依存性（ナノ粒子依存性）が存在し、抽出した miRNA-5787 の標的遺伝子 eIF5 の発現を抑制させ、細胞毒性を誘発する可能性を見出した。

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ックスマーカーの検索である。(1)に関して、共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝性毒性評価の構築のために共通して使用する二酸化チタンの評価を行った。(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、microRNA のさらなる解析を行った。

B. 研究方法

共通して使用する二酸化チタンの評価方法の確立、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。

二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：

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 JCRB 細胞バンクより入手した。A549 は MEM および添加物を加えた培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)：

本研究班の中で共通して使用する 5 種類の二酸化チタンナノ粒子（MT150A、MT500B、AMT100、AMT600、TKP102、テイカ株式会社、大阪）が国立医薬品食品衛生研究所から供与された。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、凝集を取り除き使用した。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 (DelsaMax PRO, Beckman Coulter, Inc., Georgia) で測定を行った。詳細は林分担研究者の報告書を参照いただきたい。細胞毒性評価には、Cell Counting Kit-8 (CCK8, Dojindo, Kumamoto) を使用した。

3) 二酸化チタンナノ粒子の調整：

1000-15.63 $\mu\text{g/mL}$ の TiO_2 の希釈系列を作製した。

① 4000 $\mu\text{g/mL}$ の TiO_2 を作製のため 15 mL チューブに 20 mg の TiO_2 を量り 5 mL のメディウムに溶かした。

② 水中にてソニケーター設定 PWM 30 % で 15 mL チューブの中で 1 分間、プローブを上下に動かし分散させた。

③ TiO_2 が分散浮遊しているうちに短時間で希釈系列を作製した。

4) 二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：

96 well に 5000 cells の A549 細胞を 100 μL で播種した。播種して 24 時間後に、すべての well の上清を 50 μL 抜いて、希釈系列 TiO_2 溶液を 50 μL 添加し計 100 μL になるようにして 6、12、24、48 時間インキュベートした。各インキュベート終了時間に到達したものより、CCK8 を 10 μL 各プレートに添加し、2 時間後にプレート遠心機で 5000 rpm、3 分遠心後、上清 80 μL を新しい 96 well プレートに移し替えて、450 nm の吸光度で測定した。

系列

① TiO_2 +メディウム+CCK8 : Blank

② メディウム+Cells+CCK8 : Control

③ TiO_2 +メディウム+Cells+CCK8 : Sample

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{③} - \text{①}}{\text{②}} \times 100$$

ナノマテリアルの傷害機構の解析

5) 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。

6) 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°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 はインターカーレーター法で、miRNA は TaqMan プローブ法で、CFX Connect[™] Real-Time System (BIORAD, California, USA) を用いて 95°C 10 分加熱後、 95°C 15 秒、 60°C で 1 分加熱しそれを 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。

また、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) の影響を検討するために、NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) を培養液に溶かし、10 mM となるように調整した。調整培養液を播種

24 時間後の細胞に添加し、3 時間 37°C、CO₂ 濃度 5%加湿インキュベーター内でインキュベートした後に吸引し、1x PBS で洗浄した。その後に磁性体ナノ粒子や過酸化水素に暴露した。

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, NewYork, USA) を 30 μ L、Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 0.3 μ L 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°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 μ g にタンパク量を調製したサンプル 10 μ L に 2 \times sample buffer を 10 μ L 加え、95°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 記載のブロッキング用溶液を 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 パワーブロット・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°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 II (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い行った。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

1) 二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：不溶性である二酸化チタンナノ粒子の細胞増殖への影響を評価するために、新たなプロトコルを作成し、評価を行った。

図 1-4 に、5 種類の二酸化チタンナノ粒子の濃度別、時間経過による細胞増殖への影響について示す。また、Table1 に希釈濃度と時間経過による細胞増殖促進あるいは抑

制した条件を記す。

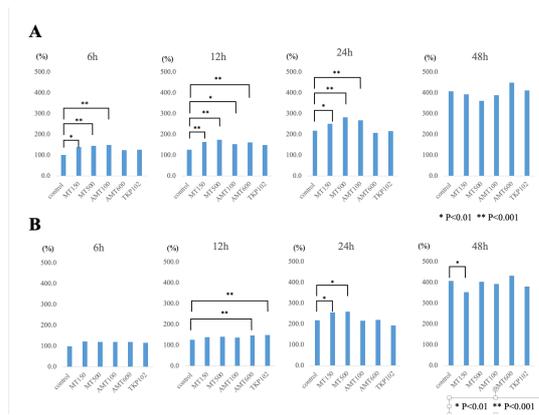
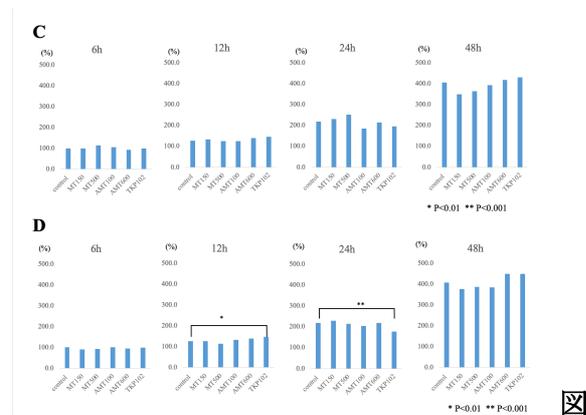


図 1 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (A)1000 µg/mL、(B)500 µg/mL

いずれも Control 群（非曝露群）に対して曝露群の多くにおいて、細胞増殖が促進するのを認めた。TIO₂ が比較的低濃度域（15.6-62.5 µg/mL）では AMT600 や TKP102 の細胞増殖が Control 群に対して高い結果となった。高濃度域（500-1000 µg/mL）においても MT500、AMT600 などでは増殖が促進を認めた。



2 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (C)250 µg/mL、(D)125 µg/mL

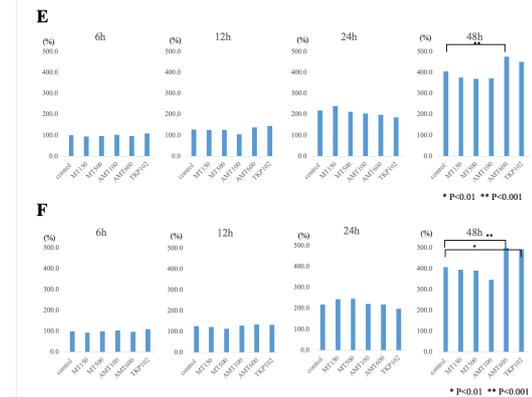


図 3 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (E)62.5 µg/mL、(F)31.25 µg/mL

一方、MT150 や AMT100 などでは、細胞増殖は低濃度域では Control 群と同等程度か以下である可能性を認めた。さらに Control 群に対して細胞増殖が減少したものは MT150 および TKP102 であり濃度は 125、500 µg/mL の添加量であった。

表 1.5 種類の二酸化チタンナノ粒子の細胞増殖への影響

A	6h	12h	24h	48h
1000 µg/ml	MT150*,MT500** AMT100**	MT150**,MT500** AMT100*,AMT600**	MT150*,MT500** AMT100**	
500 µg/ml		AMT600**,TKP102**	MT150*,MT500*	
125 µg/ml				AMT600**
62.5 µg/ml				AMT600**,TKP102*
31.25 µg/ml				AMT600**,TKP102**
15.6 µg/ml	AMT600*,TKP102*	AMT600*		
B	6h	12h	24h	48h
500 µg/ml				MT150*
125 µg/ml			TKP102**	

Statistics by dunnet's test

2) ナノマテリアルの傷害機構の解析

ナノマテリアルの傷害機構を microRNA の挙動から解析を行った。

候補 microRNA 発現解析:200 及び 400 µg/mL の磁性体ナノ粒子を曝露後 24 時間における miR-5787、miR-494-3p、miR-1207-5p の発現を Real-Time PCR で解析を行った。

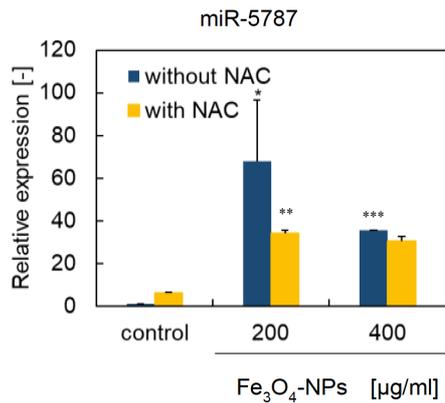


図 4. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-5787 発現量変化

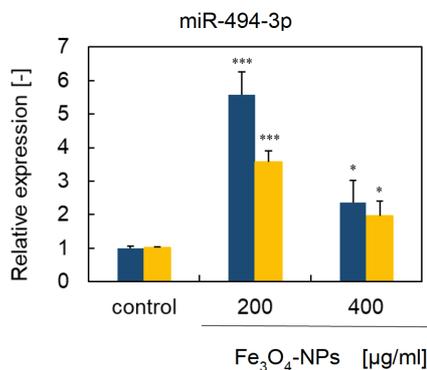


図 5. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-494-3p 発現量変化

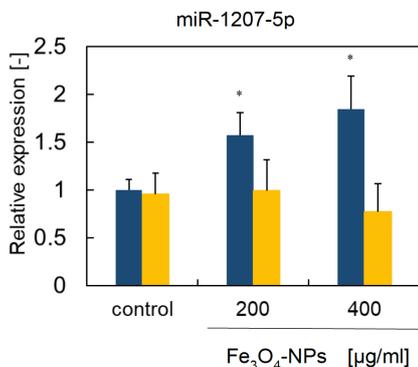


図 6. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-1207-5p 発現量変化

miR-1207-5p において、濃度依存的に発現量は増加し、miR-5787、miR-494-3p では、400 μg/mL より 200 μg/mL において、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、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつ

NAC 処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。

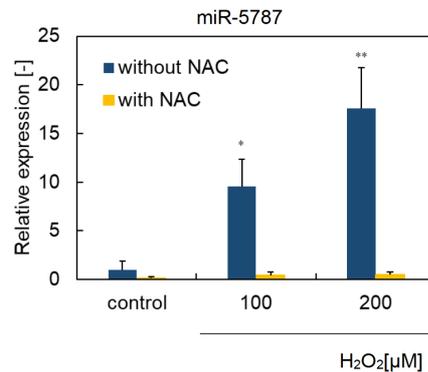


図 7. H₂O₂ 暴露による miR-5787 発現量変化

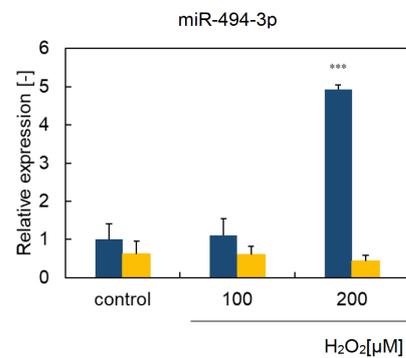


図 8. H₂O₂ 暴露による miR-494-3p 発現量変化

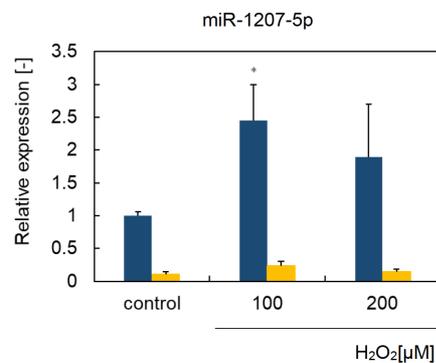


図 9. H₂O₂ 暴露による miR-1207-5p 発現量変化

eIF5 の発現解析：miR5787 が線維芽細胞の細胞増殖や成長に関与する 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。

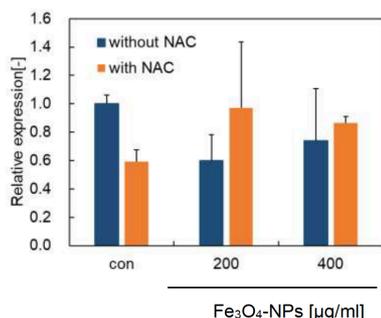


図 10. 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 mRNA 発現
磁性体ナノ粒子曝露により、特に 200 µg/mL において、eIF5 の発現量は半分程度まで減少するも、NAC 処理によりコントロール程度まで回復するのを認めた。

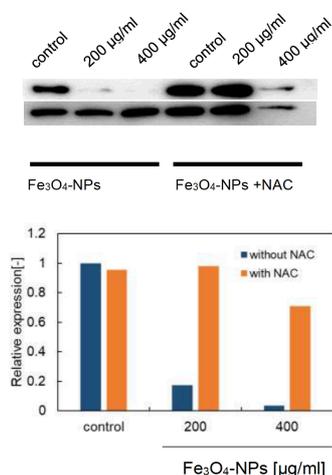


図 11. 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 タンパク発現
タンパクレベルでも、同様に磁性体ナノ粒子により、特に ROS の影響を受けた抑制を認めた。

D. まとめ

今年度の分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系に使用するための班共通の二酸化チタンナノ粒子の毒性評価方法の構築と毒性評価を行った。二酸化チタンナノ粒子は不溶性であり、in vitro 系においての評価では注意しなければならない。今回行った方法は、分散に注意し、測定時における残存二酸化チタンの影響を排除した方法である。結果は一部の粒子を除いて、細胞増殖を抑制させる方向には働かなかった。むしろ、高濃度の二酸化チタンナノ粒子曝露において、細胞増殖が促進される結果とな

った。これはすでに出されている各種報告における二酸化チタンナノ粒子の毒性情報と一致する。今後は、このナノ粒子を用いて、A549 細胞の切片担体培養系への使用を図る。

磁性体ナノ粒子の暴露により、3 種類の microRNA(miR5787、494-3p、1207-5p)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、これら 3 種類の microRNA は ROS を減少させると発現量が減少するが、必ずしも完全には抑制されなかった。これはナノ粒子による ROS 依存的な発現のみならず、ナノ粒子自体の細胞への影響による可能性も考えられた。miR-1207-5p の発現は ROS 依存的と考えられた。ROS 依存的に eIF5 の発現の変化は確認された。したがって、miRNA5787 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。

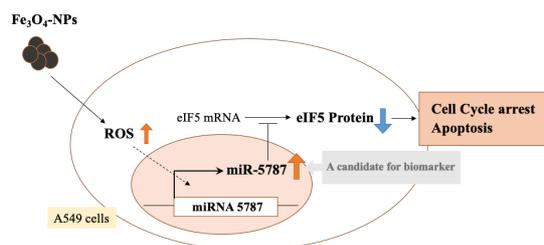


図 12. まとめ

E.提案

新規ナノマテリアル毒性評価指標の探索

今年度は、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に関して、新規ナノマテリアル毒性評価指標の可能性について、解析を始めた。その指標は、一次線毛動態である。一次線毛は細胞膜上に生じる不動性の突起物であり、この出現は中心体の消失とともに細胞周期を停止させる。比較的容易に観察できることより、A549 細胞での一次線毛を特異的な抗体で確認をした (図 6)。同細胞に障害を与えると、消失することより、細胞への障害と一次線毛の動態が関係する可能性を考え、ナノマテリアルの毒性との関係を探る予定である [Nishimura Y, Watanabe M, et al., Acv Sci, 6(1), 1801138, 2018]。

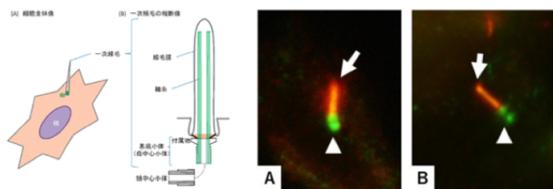


図7. 一次線毛について

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K.Ishii, T.Sasaki, K.Iguchi, M.Kato, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest. *J Clin Med*, 8(1), 44, 2019.
- (2) E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, K.Kanayama, C.Matsuda, K.Uchida, T.Shiraishi, M.Watanabe. Anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses proliferation of human pancreatic cancer cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest. *Pharmacology*, 103(5-6), 250-256, 2019.
- (3) K.Kanayama, H.Imai, E.Usugi, T.Shiraishi, YS Hirokawa, M.Watanabe. Letter to the editor: reply to Antonio Ieni “Intratumoral HER2 heterogeneity in early gastric carcinoma: potential bias in therapeutic management”. *Virchow Arch*, 474(3), 403-404, 2019.

2. 学会発表

- (1) ○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.30-April.3, 2019, Atlanta.
- (2) 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.30-April.3, 2019, Atlanta.

- (3) ○渡邊昌俊. 酸化鉄ナノ粒子はドキシソルビシンの前立腺癌細胞への細胞毒性に対してパラドキシカルな影響を示す. 第 108 回日本病理学会総会, 東京国際フォーラム, 2019 年 5 月.
- (4) ○渡邊昌俊, 中野洋.カーボンナノチューブ曝露における癌細胞株の microRNA 網羅的発現解析.第 66 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2019 年 11 月.
- (5) ○渡邊昌俊. 腫瘍に対するビオミメテジックスなマテリアルのプラットフォーム構築. 第 9 回日本泌尿器病理研究会学術集会, 日本橋ライフサイエンスビル, 東京, 2020 年 2 月.
- (6) 渡邊昌俊, 上村博司. 前立腺癌の遊走・浸潤への Zyxin の関与について.第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (7) 中川泰久, 石井健一郎, 藤原雅也, 臼杵恵梨, 広川佳史, 杉村芳樹, 渡邊昌俊. 粘性基質上培養でのヒト前立腺癌細胞と線維芽細胞の 3 次元構造形成に関わる評価. 第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (8) ○大塩里紗, 中川泰久, 渡邊昌俊, 飯島一智. 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性における miRNA 発現の解析.第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (9) 臼杵恵梨, 石井健一郎, 広川佳史, 金山和樹, 松田知世, 渡邊昌俊. 抗線維化薬ピルフェドニンは細胞周期の G0/G1 期停止を誘導することによってヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.

G. 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