

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**ナノマテリアルの胎盤毒性解析と  
その評価基盤の構築**

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

令和4（2022）年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築-----	1
堤 康央	

### II. 分担研究報告

「オートファジーが合胞体化に与える影響評価～ナノ粒子評価基盤の構築～」に関する 研究 -----	17
中島彰俊	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	24
--------------------------	----

## ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 教授

### 研究要旨

化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、催奇形性試験に代表されるように、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきである。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的であるうえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤移行・蓄積<動態>、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が今、まさに必須となる。そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク（ハザードと曝露/動態の積算）解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1) 胎盤動態、(2) 胎盤ハザード、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、(1)～(3)の情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを目指す。

令和3年度研究では、(1) 胎盤動態に関して、①トランスウェルにおける胎盤関門単層モデルの作成において、化学物質の胎盤関門透過性を評価するうえでは、ヒト絨毛由来細胞株であるJEG-3細胞株が有用であることを示した。また、(2) 胎盤ハザードに関して、②胎児毒性を示す化学物質の一部は、BeWo細胞株におけるホルモン産生を攪乱し得るものの、その発現変動の程度は化学物質により異なることを示した。さらに、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムに関して、③合胞体化前のBeWo細胞株に対するヒストン脱アセチル化剤への曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることを見出した。加えて、パイロット的な検討ではあるものの、④医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子が、胎盤細胞における合胞体化の進行を抑制することなどを明らかとした。これら成果は、ガイドラインに基づいた標準的試験法（主として生殖発生毒性に係る動物実験）との関係性について現在検証中である。**以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初年次計画の予定通り達成できている。**また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、産学官・病院、ならびに、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している。

### 研究分担者

中島彰俊・富山大学・学術研究部医学系・教授

### A. 研究目的

化学物質の生殖発生に対する影響については、

毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、催奇形性試験に代表されるように、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維

持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきである。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的である（剖検による肉眼的初見や病理解析のみ）うえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤移行・蓄積<動態>、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が今、まさに必須となる。

そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク（ハザードと曝露/動態の積算）解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1) 胎盤動態、(2) 胎盤ハザード、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、(1) ~ (3) の情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを目指す。また、本研究で構築した試験法で得られた結果とガイドラインに基づいた標準的試験法（主として動物実験）との関係性を検証すると共に、胎盤毒性が疑われる化学物質による当該スキームの検証を図る。そのうえで、近年のナノテクノロジーの進展に伴い、化粧品や食品領域をはじめ、既に様々な産業分野の製品に実用化されているナノマテリアルなどの毒性未知化学物質の胎盤毒性情報の収集を試みる。さらに、近未来的な出口として、OECDテストガイドラインや行政活用などを念頭に、協同する業界団体・学協会と連携し、本研究を実施することで、既存法の無い「統合的胎盤毒性評価スキーム」を新たに提案しようとするものである。

## B. 研究方法

### 1. 被験化学物質

バルプロ酸、ベンゾピレン、エタノール、メトトレキサート、ワーファリン、フェニトインは Wako (Osaka, Japan) より購入した。バルプロ酸とエタノールは PBS に、ベンゾピレン、ワーファリン、フェニトインは DMSO に、メトトレキサートは水酸化ナトリウムに溶解させたのち、それぞれの溶液を細胞培地で細胞障害性が認めら

れない濃度に希釈し、実験に供した。

銀ナノ粒子および金ナノ粒子は、nano Composix 社 (San Diego, CA) より購入し、表面をクエン酸修飾した、粒子径が 10 nm (nAg10、濃度 1.0 mg/mL および nAu10、濃度 1.0 mg/mL) のものを使用した。なお、以後の検討で nAg10 分散液を培地で希釈する際には、凝集を防ぐため、コーティングを行った後に実験に供した。具体的には、原液の nAg10 と 20 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を等量ずつ混合し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に、nAg10 分散液を培地で各濃度に希釈した。

### 2. 細胞培養および合胞体化誘導

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株は、JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources; Osaka, Japan; JCRB9111) より購入した。BeWo 細胞株の維持には、56°C で 30 分間の非働化処理を行った 10% ウシ胎児血清 (FBS; Biosera, Nuaille, France)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (Wako) を含む Ham's F-12 (Wako) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。胎盤細胞の合胞体化に対する影響評価に際して、BeWo 細胞株に forskolin を処置し細胞内の cAMP 濃度を上昇させることで合胞体化を誘導する *in vitro* 系を活用した。合胞体化誘導に使用した forskolin は、Cayman chemical (Ann Arbor, MI) より購入し、DMSO で希釈したのち、培地で 50 μM に調製し実験に供した。

### 3. 胎盤細胞の単層モデルの形成

ポアサイズ 0.4 μm、膜面積 0.3 cm<sup>2</sup> の Polyethylene terephthalate メンブレンを有する 24 well のセルカルチャーインサート (Falcon, Corning, NY) に 3.3 × 10<sup>5</sup> cells/well でヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株および BeWo 細胞株、また、コントロールとしてヒト血管内皮細胞 HUVEC を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間毎に培地を交換しながら、12 日間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、48 時間毎に 12 日間抵抗値を測定した。抵抗値の測定には、ミリセル ERS 装置 (Millipore, Bedford, MA) を用いた。同時に、細胞層の無い培養膜の抵抗値 (ブランク) も測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を徐算して細胞層

の TEER 値 (ohms/cm<sup>2</sup>) とした。培養 12 日目に、終濃度 1 μM の Sodium fluorescein (Na-flu; Wako)、分子量 10 kDa の fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran) および分子量 70 kDa の FITC-dextran (Sigma-Aldrich) を添加し、0、24 時間後にサンプリングした。サンプルは蛍光光度計 (GloMax, Promega, Madison WI) により、excitation 475 nm、emission 500-550 nm の条件で蛍光強度を定量した。

#### 4. Real-time RT-PCR によるタンパク質性ホルモン遺伝子の発現量評価

6 well プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo 細胞株に添加し 24 時間培養することでシンシチオトロホプラストへの融合を誘導し、被験物質を各濃度に調製後、BeWo 細胞に 72 時間添加した。その後、FastGene RNA Basic Kit (Nippon Genetics; Tokyo, Japan) のプロトコールに準じて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、各種プライマー (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan) とジーンエース SYBR qPCR ミックス α Low ROX (Nippon Gene, Tokyo, Japan) により反応溶液を調製し、CFX384 (BioRad, Hercules, CA) を用いて real-time RT-PCR を実施し、タンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB, CSH1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

#### 5. LC/MS/MS による Progesterone の評価

6 well プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。その後、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、BeWo 細胞株に添加し 24 時間培養して合胞体化を誘導した。合胞体化誘導後、被験物質を添加し、72 時間培養した。培養液 1 mL と酢酸エチル 1 mL を十分に混合させ、3 min、5000 rpm、25°C 条件下で遠心した上清 (酢酸エチル層) を回収した。酢酸

エチル上清を窒素乾固し、メタノール 100 μL に溶解させ濃縮したサンプルを LC-MS/MS により測定した。LC-MS/MS は、Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) と Waters Quattro Premier XE (Waters) が連結した装置を使用した。LC の使用カラムは C18 カラム (1.7 μm, 2.1 x 50 mm, Waters)、移動相に A : 40% 5 mM ギ酸アンモニウム超純水溶液、B : 60% 5 mM ギ酸アンモニウム アセトニトリル/メタノール混合溶液 (組成比 3:1) を用い、流速 0.4 mL/min、注入量 5 μL で測定した。MS はエレクトロスプレーイオン化法を用い、イオンモードはポジティブモードで測定した。

#### 6. Real-time RT-PCR による合胞体化関連遺伝子の発現量評価

6 well プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 および nAu10 を目的の濃度にそれぞれ希釈後、BeWo に添加し 48 時間培養した。前項と同様の方法でサンプルを調製し、CFX384 (BioRad) を用いて real-time RT-PCR を実施し、合胞体化関連遺伝子 (CGB, SDC1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

#### 7. ヒストン脱アセチル化酵素阻害と合胞体化進行との関連解明

6 well プレートに  $7.5 \times 10^4$  cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で目的の濃度に調製したトリコスタチン A (TSA, Sigma-Aldrich)、および H89 (Cayman chemical) 溶液を BeWo 細胞株に添加し、2 時間培養したのち、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo に添加し 48 時間培養することでシンシチオトロホプラストへの融合を誘導した。この時、前項と同様の方法でサンプルを調製し、CFX384 (BioRad) を用いて real-time RT-PCR を実施し、タンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB, SDC1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

ヒストン脱アセチル化酵素の発現量の解析に際しては、細胞を PBS で洗浄し、RIPA バッファーにて溶解し、15 分氷上でインキュベートした後、16,000 x g、4°C で 30 分間遠心した。上清を回収し、BCA assay (Thermo Fisher scientific) によりタンパク質量を標準化した後に、6 x SDS sample buffer と混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) した。SDS-PAGE は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動後のゲルを immobilon-P Transfer membrane (PVDF 膜; MERCK MILLIPORE, Billerica, MA) にウェット式にて 1.5 時間転写し、5% Skim milk (Wako)/TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) を添加してブロッキングした。1 次抗体として  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich)、CGB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、HDAC1、HDAC2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、2 次抗体として、HRP/anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)、HRP/anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を室温で 1 時間反応させた。TBST で洗浄後、PVDF 膜をイムノスター LD (Wako) で処理し、発光像を LAS-4000 (FUJI Film, Tokyo, Japan) により撮影した。

## 8. 細胞免疫染色による合胞体化の評価

8 well チャンバースライド (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に  $1 \times 10^4$  cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、200  $\mu$ L/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。その後、Ham's F-12 で終濃度 50  $\mu$ M に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 を 0、0.039  $\mu$ g/mL に希釈後、200  $\mu$ L/well で添加した。48 時間培養後に、PBS で 1 回 wash し、4% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を 200  $\mu$ L/well で加え、室温で 30 分間、細胞固定を行った。その後、終濃度 0.1% に調製した Triton X-100 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 5 分間添加し、細胞膜の透過処理を行った。PBS で 3 回 wash した後、1% BSA/PBS を 200  $\mu$ L/well で添加し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後 1 次抗体として anti-desmoplakin I / II (Santa Cruz

Biotechnology) を添加し、4°C で overnight させた。PBS で 3 回 wash 後、2 次抗体として Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 200  $\mu$ L/well で添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回 wash 後、ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で DAPI 染色及びサンプルの封入を行った。封入から 2 日後、共焦点顕微鏡 (SP5; Leica, Wetzlar, Germany) により蛍光画像を撮影した。撮影した蛍光画像をもとに、(合胞体栄養膜細胞内の核数/総核数) x 100 の計算式で合胞体化割合の算出を行うとともに、ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD) を用いて DAPI で染色された核の大きさを定量した。合胞体化割合の算出および核の大きさを定量は、各群それぞれ 5 視野を撮影し解析に用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月に厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「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)が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. ヒト絨毛癌細胞を用いた胎盤関門形成

化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠である。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、胎盤に対するリスク (曝露/動態とハザード) を考慮すべきである。この点、胎盤関門は母体血と胎児血間で物質輸送を制御する器官であることから、化学物質のリスクを評価するうえで *in vitro* モデルの構築が求められている。そこで本検討では、ヒト絨毛癌細胞を用いた *in vitro* 胎盤関門構築を試みた。トランスウェルセルカルチャーインサー

トにヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株および BeWo 細胞株を播種し、播種後 48 時間ごとに TEER 値を測定したところ、12 日目時点において、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株においてより高い値を示した (図 1A)。この時、Sodium fluorescein (Na-flu) (図 1B)、および分子量 10 kDa の FITC-dextran (10 kDa FD) (図 1C)、分子量 70 kDa の FITC-dextran (70 kDa FD) (図 1D) を用い、胎盤関門の透過性を評価したところ、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株において、各分子の basolateral 側への移行量がより少なくなることが示された。このことから、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株において、よりタイトな関門を形成することが示唆された。

胎盤関門において、その機能の多くはトロホブラストが担っているとされ、トロホブラストは、サイトトロホブラストと、サイトトロホブラストが合胞体化することによって生じるシンシチオトロホブラストに大別されるものの、現在汎用されている胎盤関門モデルでは、サイトトロホブラストのみを考慮したものが大半である。そのため、ヒト胎盤関門を模するためには、シンシチオトロホブラストも考慮する必要がある。現在、化学物質の胎盤動態解析の推進を目指し、シンシチオトロホブラスト層の形成に不可欠な合胞体化誘導のための最適条件を検討している。

## 2. 化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価

胎盤は妊娠維持に必須の器官であり、胎児発育や子宮環境調節の役割を担う複数のホルモンを産生している。これらホルモンの産生量は妊娠の進行に伴い適切に変化するが、ホルモンレベルが異常値を示すと、流産や器官形成異常などにつながり得る。一方で、これら胎盤ホルモン産生の異常を指標とした生殖発生毒性の評価系は皆無である。そこで、化学物質が胎盤ホルモンへおよぼす影響を評価し、そのメカニズムの解明を試みることで、胎盤ホルモン産生の制御に係る分子群の同定を図る。得られた結果について、*in vivo* の結果との検証を進めながら、胎盤ホルモン産生の制御分子の発現変動を指標とした、アッセイ系の構築を目指す。

本年度は、胎盤ホルモン産生に対する化学物質の影響を評価するために、forskolin により BeWo 細胞株を合胞体化させた後、細胞に各化学物質を処置した際のタンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB、

CSH1) の発現変動と、ステロイドホルモン (Progesterone) の産生量を解析した。実験に供した化学物質としては、胎児への毒性が知られていることから、胎盤への影響が生じうるものとして、バルプロ酸、ベンゾピレン、エタノール、メトトレキサート、ワーファリン、フェニトインを用いた。解析の結果、forskolin 処置群と比較して、それぞれの化学物質によって、異なる胎盤ホルモンバランス変動を示すことが明らかとなった (図 2)。このことから、本検討で用いた胎児毒性を示す化学物質は、胎盤におけるホルモン産生をそれぞれ異なる作用経路で攪乱することが示唆された。現在、これら化学物質を添加した際の胎盤における遺伝子発現変動を RNA-seq により評価し、胎盤ホルモン変動と遺伝子発現変動との連関を解析している。

## 3. 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化の関与

一般に、胎盤はシンシチオトロホブラストが中心となって機能している。このシンシチオトロホブラストは、単核のサイトトロホブラストが細胞融合し多核化 (合胞体化) することで形成される細胞であり、合胞体化の進行に伴い胎盤が構造、機能の両面において成熟する。従って、妊娠初期に合胞体化が正常に進行できない場合、胎盤の機能低下につながり、妊娠の成立・維持や健康な児の出産といった妊娠結果にも負の影響を生じることが示唆されている。胎盤の形成・成熟過程である、サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへの合胞体化において、ヒストン脱アセチル化が起こり、それらを阻害することで、合胞体化が抑制されることが知られている。そこで、化学物質が合胞体化へおよぼす影響を評価するうえで、胎盤におけるヒストン脱アセチル化への作用を追究し、*in vivo* の結果との検証を進めながら、合胞体化の制御分子の発現変動を指標とした、アッセイ系の構築を目指す。

本年度は、胎盤におけるヒストン脱アセチル化への作用を追究するために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA を用い、合胞体化へおよぼす影響を評価した。BeWo 細胞株に合胞体化において重要な cAMP 経路の阻害剤である H89、あるいは、TSA を 2 時間前処置した後、forskolin を 48 時間処置した際の各タンパク質発現量を解析した。その結果、TSA 添加によって、合胞体化が進行した細胞により盛んに産生されるヒト絨

毛性ゴナドトロピン $\beta$  (CGB) と Syndecan-1 (SDC1) の発現量が減少し得ることが示された (図 3)。また、TSA 添加群において、HDAC2 の発現量に有意な変動は認められなかったものの、HDAC 1 の発現量が濃度依存的に減少する傾向が得られた (図 4)。この時、H89 添加群において、forskolin 単独添加群と比較し、CGB の発現量の減少傾向が認められ、TSA 処置群でも同程度に発現量が低下していたことから、合胞体化前の TSA 曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることが示された。現在、免疫染色により合胞体化割合や細胞形態を評価すると共に、化学物質の曝露実態を踏まえ、低濃度・長時間曝露した際の合胞体化に与える影響を検討している。また、TSA のみならず、他の HDAC 阻害剤を比較対象としながら化学物質の合胞体化進行に対する影響を評価することで、化学物質の合胞体化への影響とそのメカニズムに関する情報の蓄積を進めている。

#### 4. ナノ粒子が合胞体化に与える影響評価

少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下の人工微粒子であるナノ粒子は、高い組織浸透性などの特徴的な機能を有することから利用分野が拡大している。従って、その汎用性の高さも踏まえると、老若男女が容易に曝露し得る物質である。一方で、サイズの微小さゆえに、従来素材とは異なる生体影響を誘発することが懸念されるなど、安全性情報の収集が課題となっている。本観点より我々は、妊娠期におけるナノ粒子曝露の生体影響評価にいち早く取り組み、これまでにナノ粒子が胎盤へ移行し得ることや胎仔発育不全を誘発すること、加えてナノ粒子の表面性状を改変することでハザード発現回避が可能であることを明らかとするなど、妊娠期におけるナノ粒子の安全性確保に資する情報を収集してきた。そこで本検討では、ナノ粒子の胎盤毒性の理解に向けたハザード情報の収集と将来的なナノ粒子の安全性確保に資するハザード発現機序の解明を目的に、胎盤形成・成熟過程における栄養膜細胞の合胞体化に着目しナノ粒子の生体影響評価を試みた。

ナノ粒子のモデルとしては、抗菌作用を有することから医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子、安定性の高さから化粧品などへの適用も盛んな金ナノ粒子を選択した。なお、比較検討のために粒子径をいずれも 10 nm に統一した nAg10、nAu10 を実験に供した。はじめに合胞体化に対するナノ粒子の影響を評価するために、BeWo 細胞

株に forskolin と各ナノ粒子を共処置した際の合胞体化マーカーの変動を解析した。その結果、CGB、SDC1 の発現が、forskolin 単独処置群と比較して nAg10 共処置により濃度依存的に低下することを示した (図 5A)。一方で、forskolin とともに nAu10 を処置した群においては、CGB、SDC1 の発現低下は認められなかった (図 5B)。さらに、合胞体化進行に関与する分子である *ERVW-1* および *ERVFRD-1* の mRNA 発現を評価したところ、nAg10 共処置群において、forskolin 添加群と比較して *ERVFRD-1* の mRNA の発現が有意に抑制されることを明らかとした (図 6A)。一方で、nAu10 共処置群においては、いずれも有意な発現変動は認められなかった (図 6B)。

そこで、nAg10 が BeWo 細胞株の合胞体化を抑制しているかを評価するため、BeWo 細胞株に 0.039  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の nAg10 および forskolin を 48 時間添加し、細胞境界で発現する desmoplakin I / II の発現を細胞免疫染色により評価した。その結果、nAg10 非添加群と比較して forskolin 単独添加群において、desmoplakin I / II の発現減少が認められたものの、nAg10 と forskolin の共処置群では、依然として desmoplakin I / II の細胞境界での強い発現が認められた (図 6A)。また、撮影した蛍光画像をもとに、総核数に対する合胞体栄養膜細胞中の核数を計数し、合胞体化割合を算出したところ、nAg10 処置により合胞体化割合が低下することが示された (図 6B)。さらに、合胞体化により形成される合胞体栄養膜細胞の特徴の一つである核同士の凝集によるサイズの増大に関して、ImageJ を用いて DAPI で染色された核の大きさを定量することで評価した。解析の結果、非添加群と比較して、forskolin 添加群において合胞体化により平均で約 1.6 倍程度、核が大きくなっていることが確認された一方で、forskolin と nAg10 を共処置することで、核のサイズ増大が抑制されることが示された (図 6C)。以上の結果から、nAg10 は、合胞体化の進行を抑制している可能性が示された。現在、nAg10 による合胞体栄養膜細胞の形成抑制が、動物レベルにおいても認められるかについて検討を進めることで、ナノ粒子が胎盤形成・成熟過程に及ぼす影響について理解を進めている。

#### E. 結論

本年度は、(1) 胎盤動態に関して、①トランスウェルにおける胎盤関門単層モデルの作成に

において、化学物質の胎盤関門透過性を評価するうえで、ヒト絨毛由来細胞株である JEG-3 細胞株が有用であることを示した。また、(2) 胎盤バザードに関して、②胎児毒性を示す化学物質の一部は、BeWo 細胞株におけるホルモン産生を攪乱し得るものの、その発現変動の程度は化学物質により異なることを示した。さらに、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムに関して、③合胞体化前の BeWo 細胞株に対するヒストン脱アセチル化剤への曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることを見出した。加えて、パイロット的な検討ではあるものの、④医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子が、胎盤細胞における合胞体化の進行を抑制することなどを明らかにした。これら成果は、ガイドラインに基づいた標準的試験法（主として生殖発生毒性に係る動物実験）との関係性について現在検証中である。以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初予定通り研究計画を実施している。また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、産学官・病院、ならびに、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している（G. 研究成果参照）。

近年、低出生体重児や早産の母体などが飛躍的に増加し、少子高齢社会の大きな問題となっている。本観点から、化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されている。一方で、化審法に基づくリスク評価において対象とされる評価項目の中でも、化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性等の問題から、行政判断に活用できる十分な情報が世界的に観ても圧倒的に不足している。さらに化審法をはじめとする化学物質に係る厚生労働行政においては、基本的に、化学物質の構造式（物質名）で規制されており、化学物質の粒子サイズや形状といった物性の違いと毒性発現の連関は十分に考慮されていない。こうした観点から、本研究は化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明により、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームを構築するものであり、生殖発生毒性学的観点からの化学物質のリスク解析基盤を構築し、リスク管理に係る新たな政策形成に資する知見の提供に大きく貢献するのみなら

ず、化審法における化学物質のリスク評価に資する毒性情報の創出や OECD テストガイドラインへの展開に資する知見の集積につながる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ogawa T., Okumura R., Nagano K., Minemura T., Izumi M., Motooka D., Nakamura S., Iida T., Maeda Y., Kumanogoh A., Tsutsumi Y., Takeda K. : Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 534: 540-546, 2021.
2. Eto S., Higashisaka K., Koshida A., Sato K., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles exacerbate hepatic damage through the activation of acquired cell-mediated immunity., *Nano Ex.*, 3(1): 015002, 2022.
3. Eto S., Koshida A., Tsujino H., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silica particles with human protein corona shows sensitization potential in the human cell line activation test., *BPB Reports*, 5(1): 1-4, 2022.

### 【総説・その他】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央 : 微粒子曝露と脆弱な世代への健康影響～胎盤毒性/動態解析を例に～., *BIO Clinica.*, 37 (1), 59-63, 2022.

### 2. 学会発表

#### 【シンポジウム等】

1. 堤 康央 : ナノマテリアルの健康影響～未病とのかかわりは? ～., 富山大学大学院特別セミナー, オンライン, 2021年6月.
2. 東阪和馬 : ナノマテリアルと胎盤毒性., 第29回日本胎盤学会学術集会, オンライン, 2021年11月.
3. 東阪和馬 : 物性-動態-毒性の連関解析に基づく、脆弱な世代へのナノ粒子の健康影響評価

と安全性確保., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

4. 東阪和馬: ヒトの健康へのリスク解析に資するナノマテリアルの神経細胞分化におよぼす影響とその機序解明., 日本薬学会第 142 年会, 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月. (シンポジウム: 化学物質のヒト健康影響評価とリスク解析の今後 ~若手研究者目線で~)

#### 【国内学会発表】

1. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, 井阪 亮, 山口慎太郎, 清本琴淑, 北原 剛, 小林純大, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: BeWo細胞合胞体化モデルを活用した胎盤形成過程に対するナノマテリアルの安全性評価., 第 46 回日本化粧品学会., オンライン, 2021 年 6 月.
2. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによる胎盤毒性とその誘導機序解明., フォーラム 2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー., オンライン, 2021 年 9 月.
3. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 東阪和馬, 堤 康央: 実環境中のマイクロプラスチックの生体影響評価の基盤構築., 第 18 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム., オンライン, 2021 年 9 月.
4. 東阪和馬, 仲本 有里菜, 小林純大, 北原剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 化学物質の胎盤毒性解析に向けて-胎盤細胞のトランスporter発現に対するバルブロ酸の影響解析., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
5. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 実環境中を模したマイクロプラスチックの細胞毒性評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
6. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本 有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-銀ナノ粒子が誘導する胎盤細胞の合胞体化抑制における活性酸素種の関与., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

7. 小林純大, 東阪和馬, 仲本 有里菜, 北原剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 化学物質の胎盤動態解析に向けて-胎盤栄養膜細胞における合胞体化の誘導条件に関する検討., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
8. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 神経細胞における非晶質ナノシリカの動態評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
9. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 浅原時泰, 生野雄大, 東阪和馬, 堤 康央: マイクロプラスチックの細胞毒性及び遺伝毒性評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
10. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 小林純大, 仲本 有里菜, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-非晶質ナノシリカ曝露による胎盤ホルモン産生への影響., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

#### 【国際学会発表】

1. Higashisaka K., Sato K., Eto S., Koshida A., Ogura M., Haga Y., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y. : The effect of silica nanoparticles on testis tissue., The 10<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology, Virtual Event, 20-22 April, 2021.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

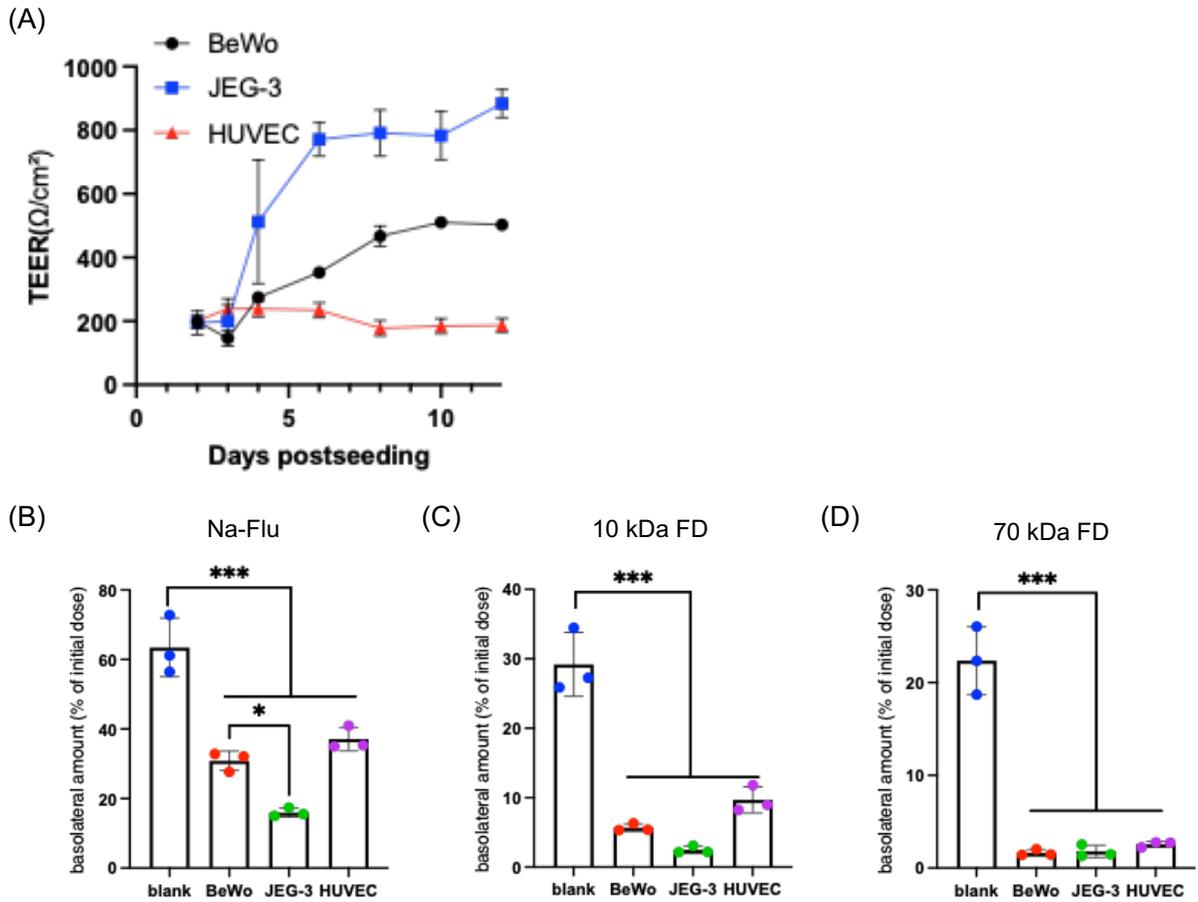


図1：ヒト絨毛癌細胞を用いた胎盤関門

(A) セルカルチャーインサートにヒト絨毛由来JEG-3細胞株およびBeWo細胞株、また、コントロールとしてヒト血管内皮細胞HUVECを播種し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub>条件下で48時間毎に培地を交換しながら、12日間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、48時間毎に12日間抵抗値を測定した。抵抗値の測定に際しては、細胞層の無い培養膜の抵抗値をブランク)を測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を徐算して細胞層のTEER値 (ohms/cm<sup>2</sup>) とした。培養12日目に、終濃度1 μMの (B) Sodium fluorescein (Na-Flu)、(C) 分子量10 kDaのFITC-dextran (10 kDa FD)、(D) 分子量70 kDaのFITC-dextran (70 kDa FD) を添加し、0、24時間後にサンプリングし、各層における蛍光強度を定量することで、その移行割合を算出した。Data are presented as mean ± SD (n = 3) . \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001 by Tukey's method.

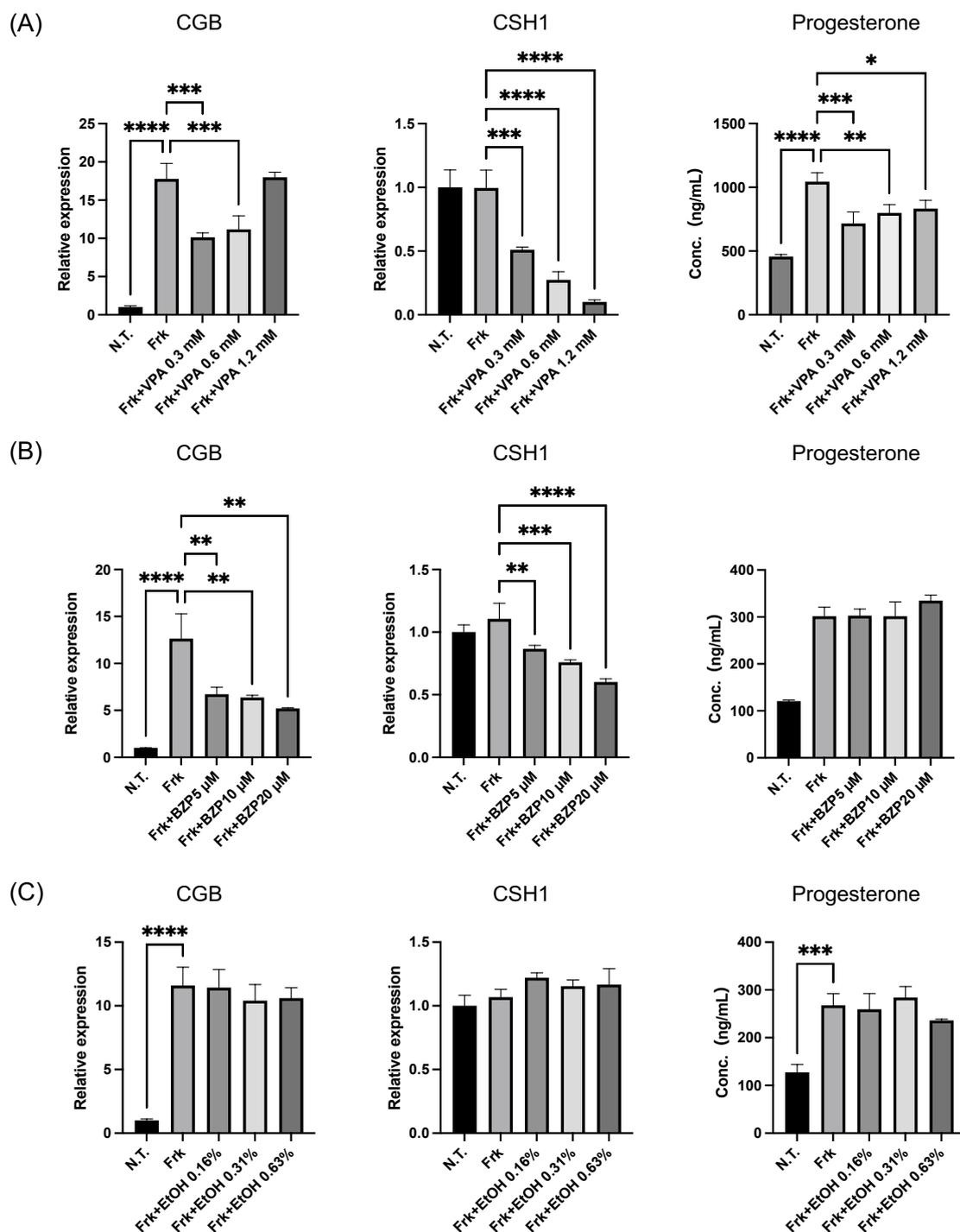


図2：化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価

BeWo細胞株に50 μM forskolin (Frk) を添加した24時間後に、(A) バルプロ酸 (VPA)、(B) ベンゾピレン (BZP)、(C) エタノール (EtOH)、(D) メトトレキサート (MTX)、(E) ワーファリン (WAF)、(F) フェニトイン (Pht) を添加して72時間培養した。培養後の細胞を回収してRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、β-Actinで標準化することで比較した。また、細胞培養液に含まれるProgesteroneの濃度をLC/MS/MSにより測定した。Data are presented as mean ± SD. \**P* < 0.05 by Tukey's method.

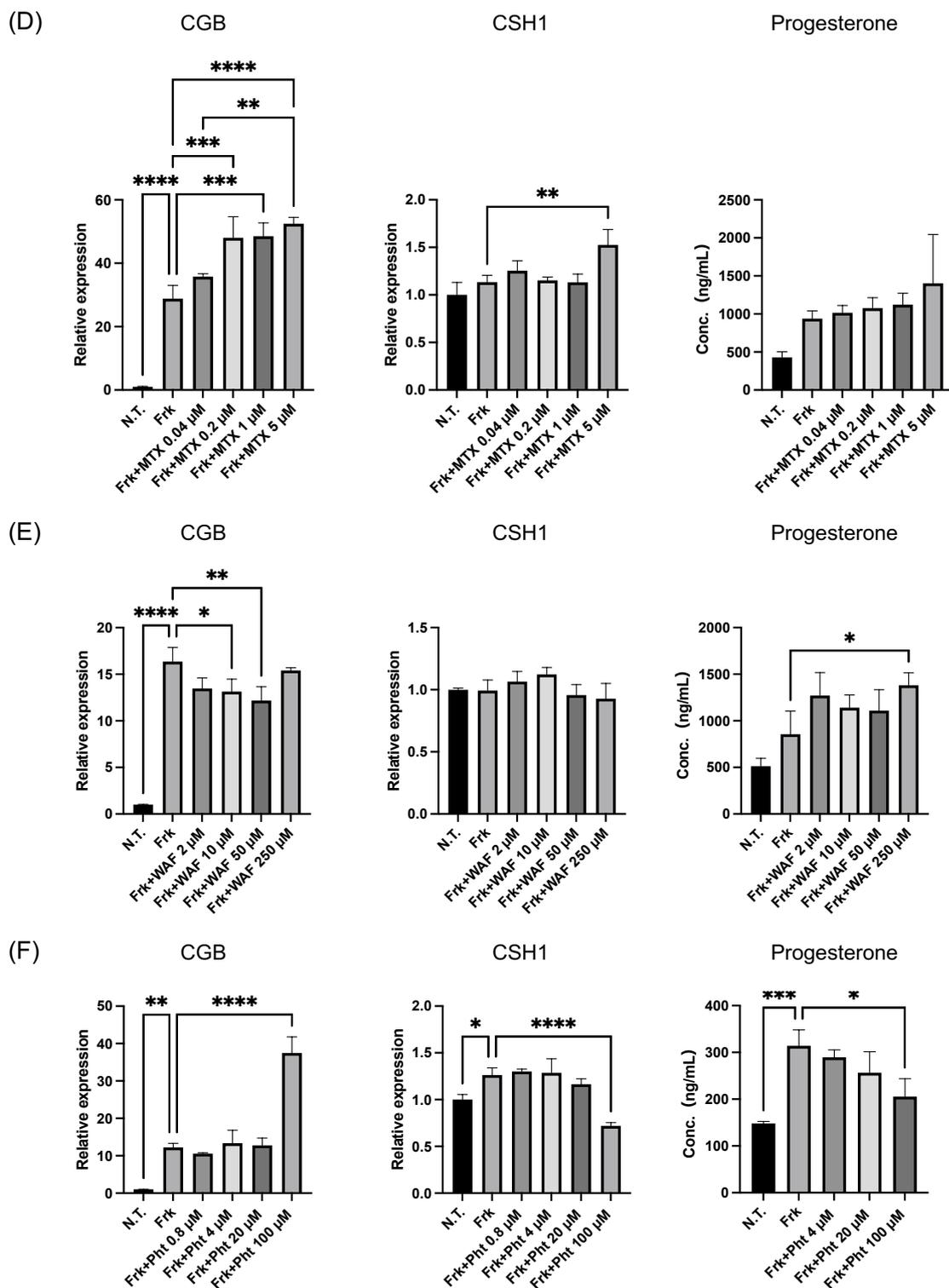
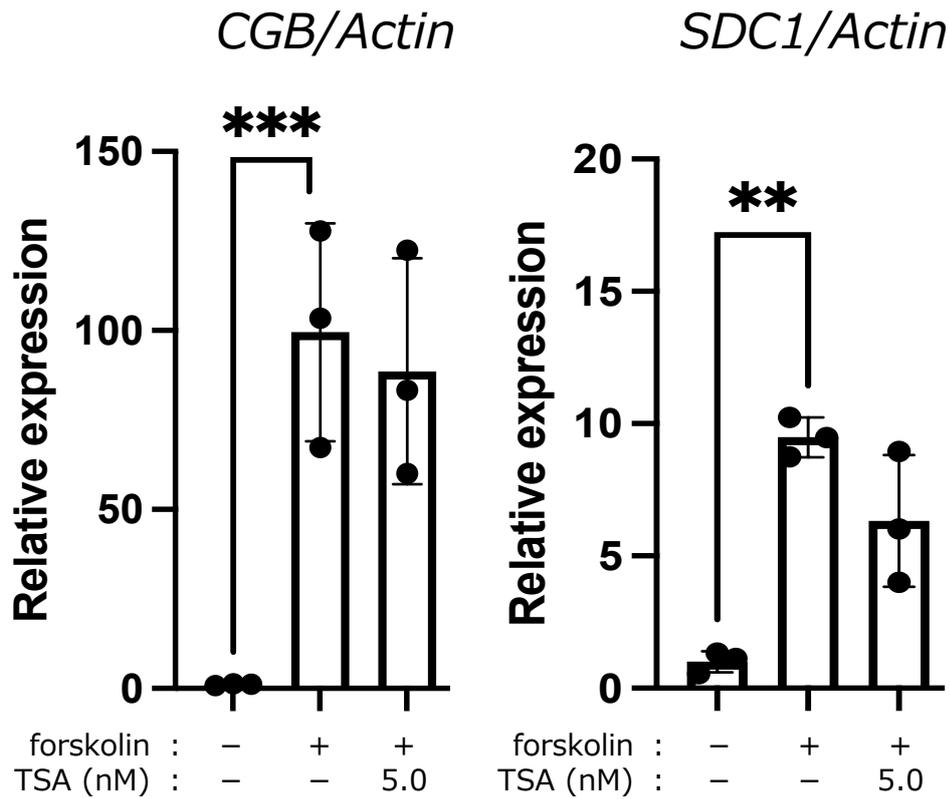


図2：化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価（続き）

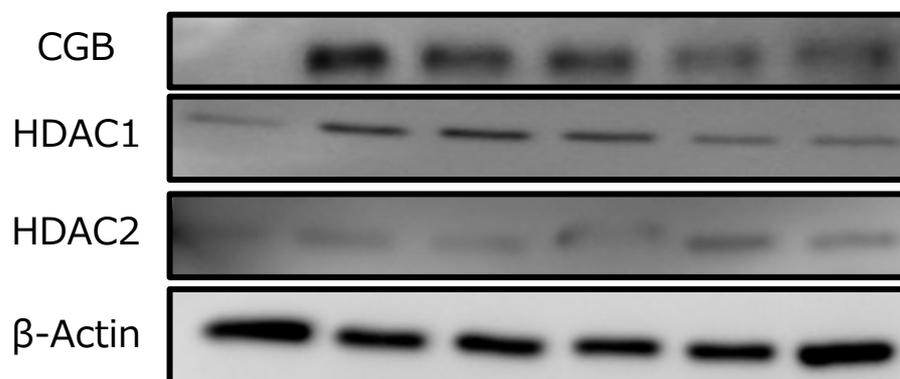
BeWo細胞株に50  $\mu$ M forskolin (Frk) を添加した24時間後に、(A) パルプロ酸 (VPA)、(B) ベンゾピレン (BZP)、(C) エタノール (EtOH)、(D) メトトレキサート (MTX)、(E) ワーファリン (WAF)、(F) フェニトイン (Pht) を添加して72時間培養した。培養後の細胞を回収してRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 $\beta$ -Actinで標準化することで比較した。また、細胞培養液に含まれるProgesteroneの濃度をLC/MS/MSにより測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $P$  < 0.05 by Tukey's method.



**図3 : 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化の関与**

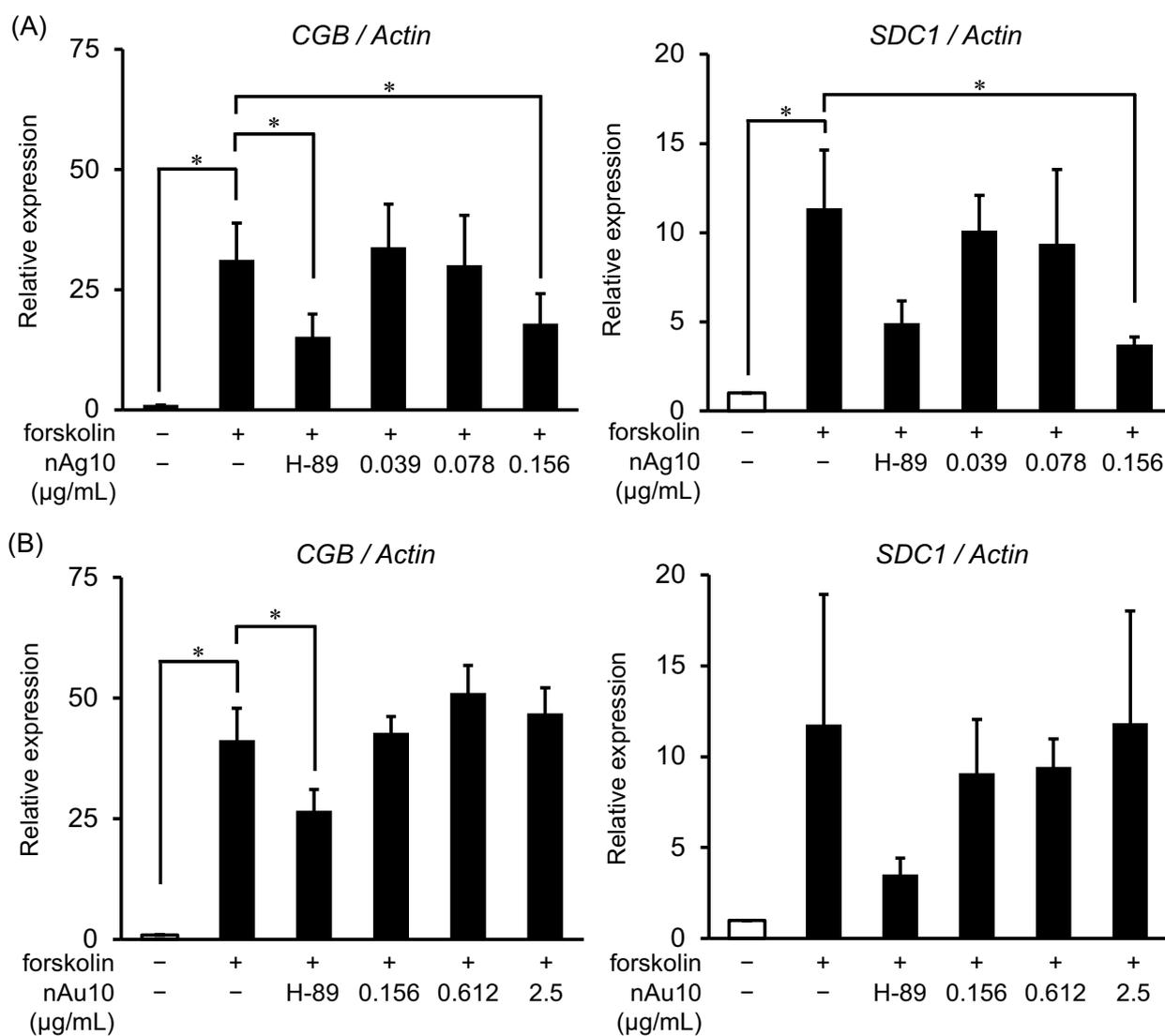
BeWo細胞株に、TSAを5.0 nMの濃度で2時間処置した後、50  $\mu$ M forskolinを処置した。48時間後、細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 $\beta$ -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $P$  < 0.05 by Dunnett's method.

forskolin :	-	+	+	+	+	+
TSA (nM) :	-	-	-	0.2	1.0	5.0
H89 ( $\mu$ M) :	-	-	10	-	-	-



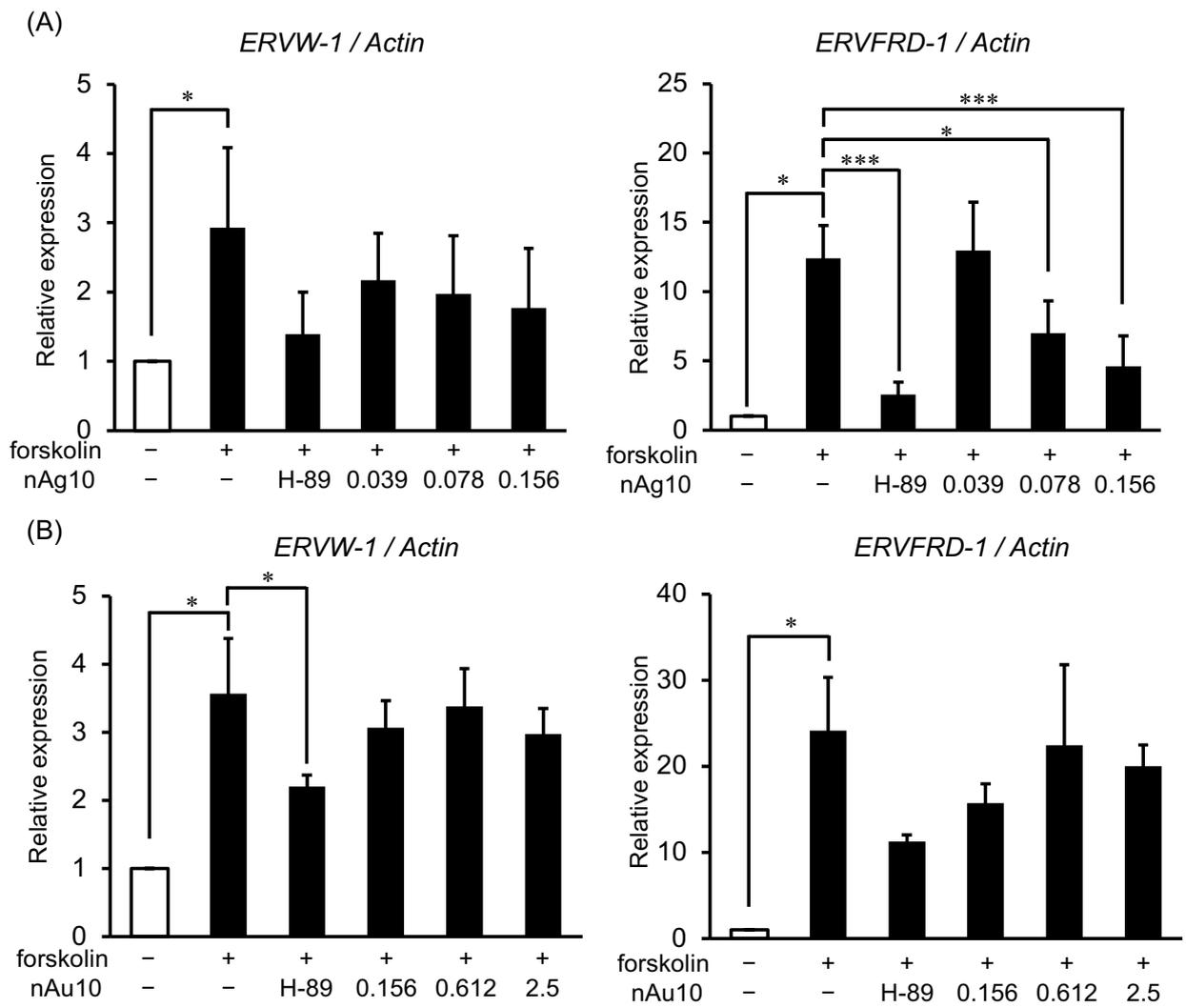
**図4 : 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化酵素の発現変動**

BeWo細胞株に、H89 (10  $\mu$ M) あるいはTSA (5.0 nM) を2時間処置した後、50  $\mu$ M forskolinを処置した。48時間後、細胞を回収しタンパク質を抽出し、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、CGB、HDAC1、HDAC2の発現量を解析した。



**図5 : ナノ粒子曝露による合胞体化マーカーの発現変動解析**

BeWo細胞株に (A) nAg10 (0.039、0.078、0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、(B) nAu10 (0.156、0.612、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を50  $\mu\text{M}$  forskolinと共に処置した。48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 $\beta$ -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  by Tukey's method.



**図6：ナノ粒子曝露による合胞体化マーカーの発現変動解析**

BeWo細胞株に (A) nAg10 (0.039、0.078、0.15  $\mu\text{g/mL}$ )、(B) nAu10 (0.156、0.612、2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) を50  $\mu\text{M}$  forskolinと共に処置した。48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを複製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 $\beta$ -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  by Tukey's method.

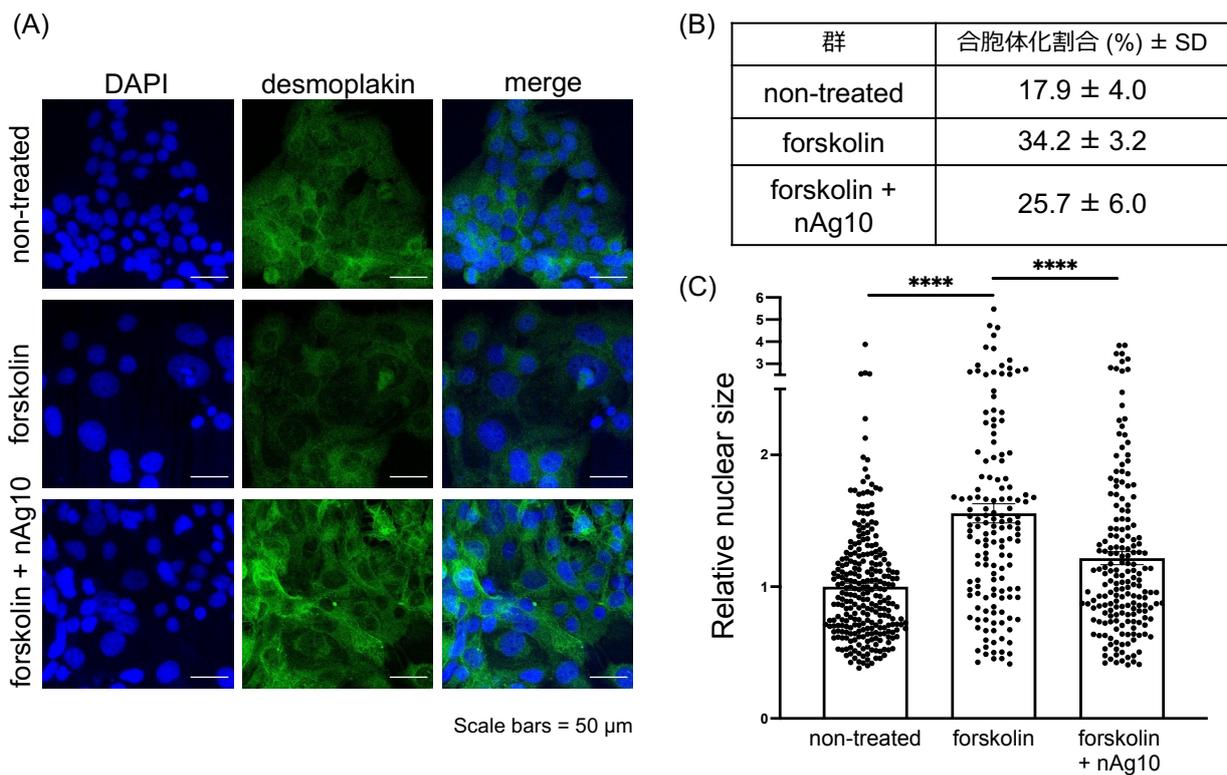


図7：合胞体栄養膜細胞の形態評価および合胞体化割合の算出

(A) BeWo細胞株に、nAg10を0、0.039 μg/mLの濃度で50 μM forskolinと共に処置し、48時間後に細胞を固定し、細胞免疫染色を実施した。共焦点顕微鏡 (SP5; Leica) により蛍光画像を撮影した。DAPI (blue)、desmoplakin I/II (green) を示している。各群5視野を撮影し以降の解析に用いた。Scale bars = 50 μm (B) 撮影した蛍光画像をもとに、(合胞体栄養膜細胞内の核数/総核数) × 100の計算式で合胞体化割合の算出をした。(C) ImageJを用いてDAPIで染色された核の大きさを定量した。\*\*\*\* $P < 0.0001$  by Steel-Dwass test.

## 「オートファジーが合胞体化に与える影響評価～ナノ粒子評価基盤の構築～」に関する研究

研究分担者 中島 彰俊 富山大学学術研究部医学系 教授

### 研究要旨

胎盤形成不全は妊娠高血圧腎症と密接に関連しており、胎児発育不全に影響を与える。胎盤の適切な発育には、細胞内恒常性機構であるオートファジーが重要であり、オートファジーの制御異常が胎盤形成不全を伴う妊娠高血圧腎症発症に寄与することを明らかにしてきた。加えて、オートファジーの抑制は絨毛細胞におけるナノ粒子蓄積に関与することも明らかにしてきた。しかし、オートファジーの抑制が栄養膜細胞、特に合胞体化（細胞融合、ホルモン産生）に影響を与えるかは不明であり、ナノ粒子による胎盤形成への影響を検討する上で、そこを明らかにする必要がある。我々は、絨毛癌由来BeWo細胞株と初代ヒト絨毛細胞であるPHT細胞を用いて、合胞体化におけるオートファジーの影響を調べた。その結果、PHT細胞およびBeWo細胞において、合胞体化が進むことでオートファジー活性が低下することが観察された。次にリソソームのV-ATPaseを抑制することで（それによりBafilomycin A1はオートファジー抑制に働く）、BeWo細胞のhCG産生、CYP11A1発現（分化マーカー）、p21発現（細胞周期停止マーカー）、細胞融合が阻害されることが分かった。PHTでも同様の結果が得られた。以上より、オートファジー/リソソーム経路は、栄養膜細胞の分化・融合に重要な役割を果たし、合胞体化に関わることを明らかにした。オートファジー抑制が栄養膜細胞の分化不全およびナノ粒子蓄積に関与することから、現在栄養膜細胞におけるナノ粒子蓄積と合胞体化の関連を解明することで、胎盤形成不全、ひいては妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の要因を明らかにすることを計画している。

### A. 研究目的

絨毛細胞におけるオートファジー抑制がナノ粒子蓄積に関与することを報告してきた。そこでナノ粒子との関連を検討する前段階として、絨毛栄養膜細胞の合胞体化におけるオートファジーが如何に関与するかを調べることにした。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞培養

絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株を使用し、20%FBS および 1%Penicillin/streptomycin を添加した Ham's F12 培地で培養した。また、初代ヒト栄養膜細胞である PHT 細胞を使用し、10%FBS、1%Penicillin/streptomycin、epidermal growth factor(10ng/mL) および Y27632(10 $\mu$ M)を添加した Iscove's Modified Dulbecco's 培地で培養した（それにより分化が進行する系）。PHT 細胞は帝王切開で得られた合併症のない満期の胎盤より採取した。すべての胎盤は 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

#### 2. タンパク質定量の評価

BeWo 細胞株に Forskolin 25 $\mu$ M を添加し分化を誘導した。分化前後での LC3-II 蛋白量を調べ、オートファジー活性化を評価した。PHT 細胞は培養日数の経過により分化する細胞であり、培養 3 日目および 5 日目の LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性化を評価した。その他オートファジー関連蛋白質である p62、TFEB の発現量も評価した。分化の指標としては CYP11A1 および hCG の蛋白発現を評価した。さらに分化に伴う細胞周期停止（細胞老化にも関わるとされる）を評価するため、p21 蛋白発現も評価した。

オートファジー阻害剤として Bafilomycin A1(20nM)、オートファジー活性化剤として Torin(10 $\mu$ M)、Tat-beclin1 (20 $\mu$ M) を使用した。BeWo 細胞株において Forskolin 25 $\mu$ M 投与可に上記試薬を添加し、分化におけるオートファジーの関連を調べた。分化の指標として CYP11A1 お

よび hCG 蛋白発現を評価した。

すべての蛋白質は Western blotting により検出し、Image J を使用して定量化した。

### 3. BeWo 細胞の融合評価

BeWo 細胞に Forskolin 25 $\mu$ M を添加し分化を誘導した。BeWo 細胞の融合を評価するため、細胞免疫染色を行った。核は Hoechst33343、細胞膜は Di-8-ANEPPS で染色した。Zeiss LSM700 共焦点顕微鏡を使用し画像を得た。融合指数は、融合細胞の総核数/全ての細胞の総核数で計算した。無作為に 6 視野を選択し、評価を行った。

### 4. 統計解析

群間差の比較には、Kruskal-Wallis 検定および Mann-Whitney 検定を用いた。P<0.05 を統計的に有意であるとみなした。データは JMP を使用して解析した。

#### (倫理面への配慮)

PHT 細胞は共同研究施設である成育医療研究センターより譲渡された。全ての患者よりインフォームドコンセントは得ており、倫理面における問題はない。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. 合胞体化においてオートファジーは活性化しない

栄養膜細胞 (トロフォブラスト) における合胞体化によるオートファジー活性を評価するため、まず PHT 細胞を使用し評価を行った。PHT 細胞は培養日数の経過により分化する細胞であり、培養 3 日目および 5 日目の LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性化を評価した。またオートファジーフラックス (その時点での活性指標) を評価するため、蛋白回収 24 時間前に Bafilomycin A1 20nM を投与した。培養 3 日目でオートファジーフラックスを認めたのに対し、培養 5 日目では認められなかった (図 1A-B)。またオートファジー関連蛋白である p62 蛋白に関しても、培養日数による有意な差を認めなかった (図 1C-D)。

BeWo 細胞は PHT 細胞と異なり、細胞性栄養膜細胞 (CTB) から合胞体栄養膜細胞 (STB) までの増殖期を容易に観察することが可能である (図 2A)。よって合胞体化におけるオートファジ

ー機構をより明確にするために、BeWo 細胞株を使用した。Forskolin 25 $\mu$ M を 72 時間添加することで合胞体化 (分化および融合) を誘導し、オートファジーフラックスを評価したところ、合胞体化完了後では、オートファジーフラックスの上昇を認めなかった (図 2B)。この結果は PHT の結果と一致した。BeWo 細胞株における Forskolin による分化に関しては、hCG および CYP11A1 発現増加より確認された (図 2C-E)。また合胞体化に伴いオートファジーにより分解される基質である p62 の増加、オートファジーの主要制御因子である TFEB 減少も観察された (図 2F-H)。

以上よりトロフォブラストの合胞体化において、オートファジー活性の低下が示唆された。

#### 2. オートファジー抑制はトロフォブラストの合胞体化を抑制する

合胞体化によりオートファジー活性が低下することが明らかとなったため、次に CTB から STB への分化経過におけるオートファジーの必要性を評価した。BeWo 細胞を Forskolin 存在下で、オートファジー抑制剤である Bafilomycin A1 20nM と活性剤である Torin 10 $\mu$ M あるいは Tat-Beclin1 20 $\mu$ M で処置した。結果、Bafilomycin A1 投与により分化の指標である CYP11A1、老化マーカーである p21 の有意な低下を認めた (図 3A-D)。さらにオートファジー抑制が細胞間融合に影響を与えるかを評価するため、Forskolin および Bafilomycin A1 投与下での BeWo 細胞の融合指数を評価した。その結果、Forskolin 投与により有意に増加した細胞融合が、Bafilomycin A1 併用により顕著に減少した (図 3E-H)。以上の結果より、オートファジーの抑制が BeWo 細胞における合胞体化阻害を誘発していることが示唆された。

#### 3. オートファジーの抑制はトロフォブラストの hCG 分泌を阻害する

オートファジーの阻害により CTB から STB での融合を阻害したことが明らかとなったため、次にオートファジー抑制によりトロフォブラストの機能である hCG 産生および分泌に影響があるのかを評価した。その結果、Forskolin 投与により有意に増加し hCG 産生は、Bafilomycin A1 投与により有意に減少した (図 4A-B)。さらに、上清中の hCG 分泌も有意に低下した (図 4C-D)。PHT 細胞でも Bafilomycin A1 投与により細胞内 hCG の低下を認めた (図 4E)。以上より、オートファ

ジー抑制がトロフォブラストにおける hCG 産生および分泌を抑制することが示された。

## E. 結論

トロフォブラストにおいて、合胞体化後にはオートファジー機能が低下しており、また合胞体化前にオートファジーを抑制することで合胞体化が阻害されることが明らかとなった。このことはオートファジー活性化がトロフォブラストの合胞体化の開始を制御していることを示している。

我々はこれまでの研究で、オートファジー抑制が絨毛細胞におけるナノ粒子蓄積に関与することを報告している。しかしながら、臨床面でのナノ粒子の影響は明らかとはなっていない。今後の課題として、1) 胎盤組織（絨毛組織）および絨毛細胞において、ナノ粒子はオートファジーを活性化するのか？抑制するのか？ 2) オートファジー抑制状態での、ナノ粒子の侵入は合胞体化に如何に影響するのか？仮説としては、ナノ粒子蓄積が機能的抑制に繋がると考えられるが、これら因子は胎盤低形成につながるのか？今後、合胞体化とナノ粒子との関連を明らかにすることで胎盤低形成が要因とされる胎児発育不全や妊娠高血圧腎症の要因を解明することを目標としている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Furuta A, Shima T, Kawaguchi M, Yamaki-Ushijima A, Yasuda I, Tsuda S, Yoneda S, Higashisaka K, Cheng SB, Matsumoto K, Tsutsumi Y, Sharma S, Saito S, Nakashima A.: The autophagy-lysosomal machinery enhances cytotrophoblast-syncytiotrophoblast fusion process. *Reprod Med.* In press

### 【総説・その他】

なし

### 2. 学会発表

1. Furuta A., Kawaguchi M., Yamaki A., Tomoko S., Yoneda S., Nakashima A.: Regulation of Heme Oxygenase-1 (HO-1), antioxidant, mediated with autophagy in

trophoblasts., The 36<sup>th</sup> Annual Meeting Japanese Society for Immunology of Reproduction, 29-30 October, 2021.

2. 古田 惇, 川口美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: 絨毛細胞においてオートファジーは抗酸化ストレスタンパク HO-1 発現維持に関与する., 第 29 回日本胎盤学会学術集会・第 39 回日本絨毛性疾患研究会, 2021 年 11 月 26 日-27 日.
3. 古田 惇, 川口美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: 絨毛細胞における抗酸化ストレスタンパク HO-1 発現とオートファジーの関与., 第 41 回日本妊娠高血圧学会学術集会, 2021 年 12 月 24 日-25 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

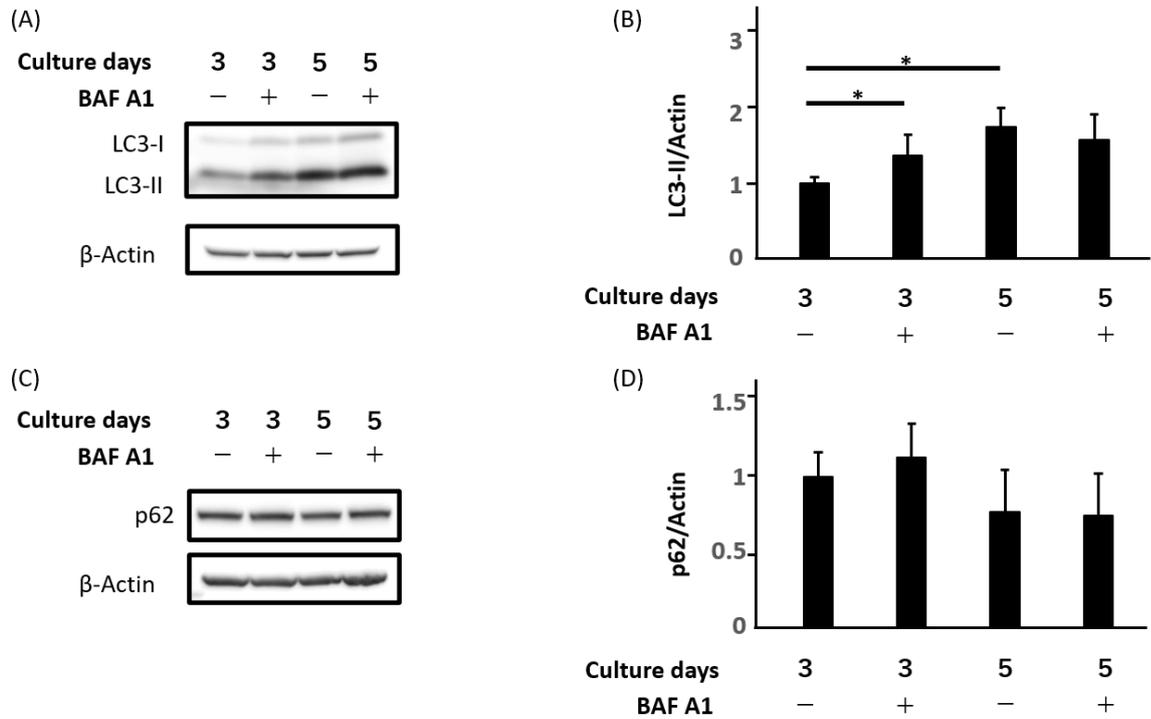
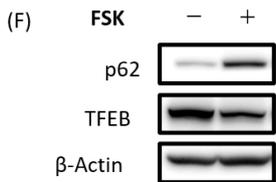
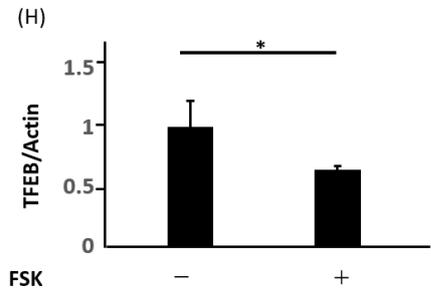
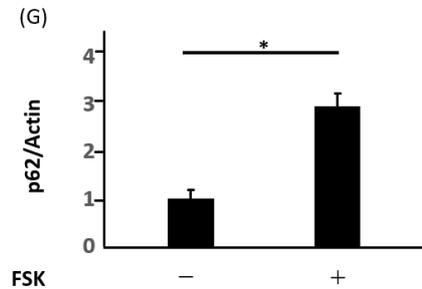
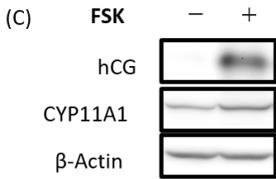
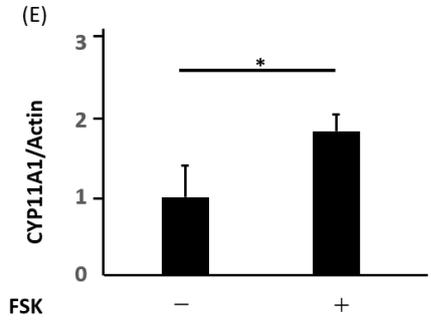
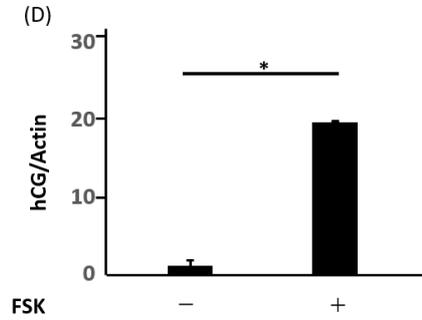
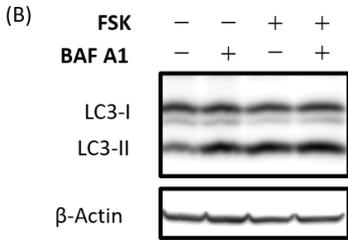
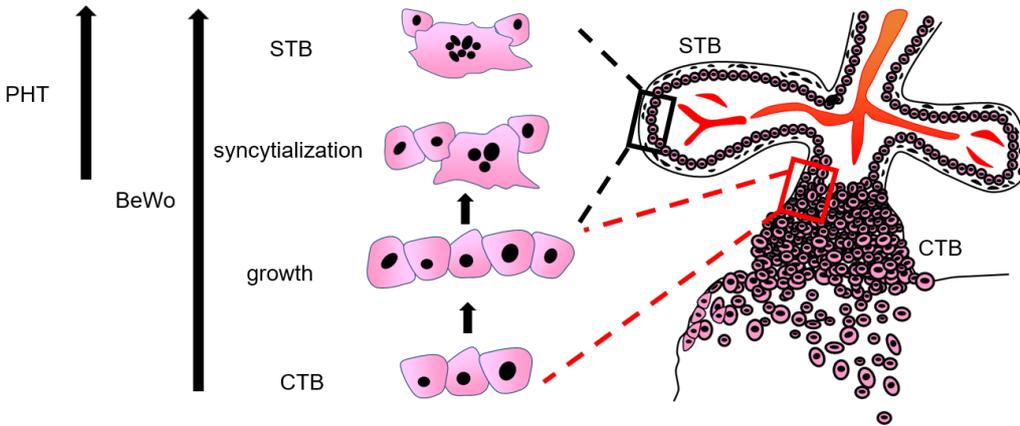


図1：初代ヒト絨毛芽細胞（PHT）の分化とオートファジーのフラックス

PHTを3日および5日間培養し、合胞体化を誘導した。この細胞をBafilomycin A1(BAF A1、20nM)で24時間処理し、オートファジーフラックスを確認した。タンパク質レベルはウェスタンブロットで検出し、タンパク質定量はImage Jを用いて計算した。

(A,B) オートファゴソームマーカーにはLC3-IIのタンパク質発現を評価した。(C,D) オートファゴソームの基質であるp62のタンパク質発現を評価した。グラフは3つの独立した結果から得られたものであり、有意差検定を行った。\*P < 0.05

(A) **Differential models for syncytialization**



**図2 : BeWo細胞における分化過程でのオートファジー活性の低下は、TFEBの減少に起因する**

(A) BeWo細胞と初代ヒト絨毛芽細胞 (PHT) が、細胞栄養芽細胞 (CTB) から細胞栄養芽細胞 (STB) という流れで合胞体化する際の特性の違いを示した図。BeWo細胞をフォルスコリン (FSK, 25μM) で処理し、シンシチリア化を誘導した。(B) Bafilomycin A1 (BAF A1 20nM) 存在下でオートファジー流束を評価するためにLC3を評価した。(C,D,E) 分化の指標として、hCGとCYP11A1のタンパク質の発現を評価した。(F,G,H) FSK存在下での分化過程におけるオートファジー制御タンパク質の評価として、p62とTFEBのタンパク質発現を評価した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。\*P < 0.05

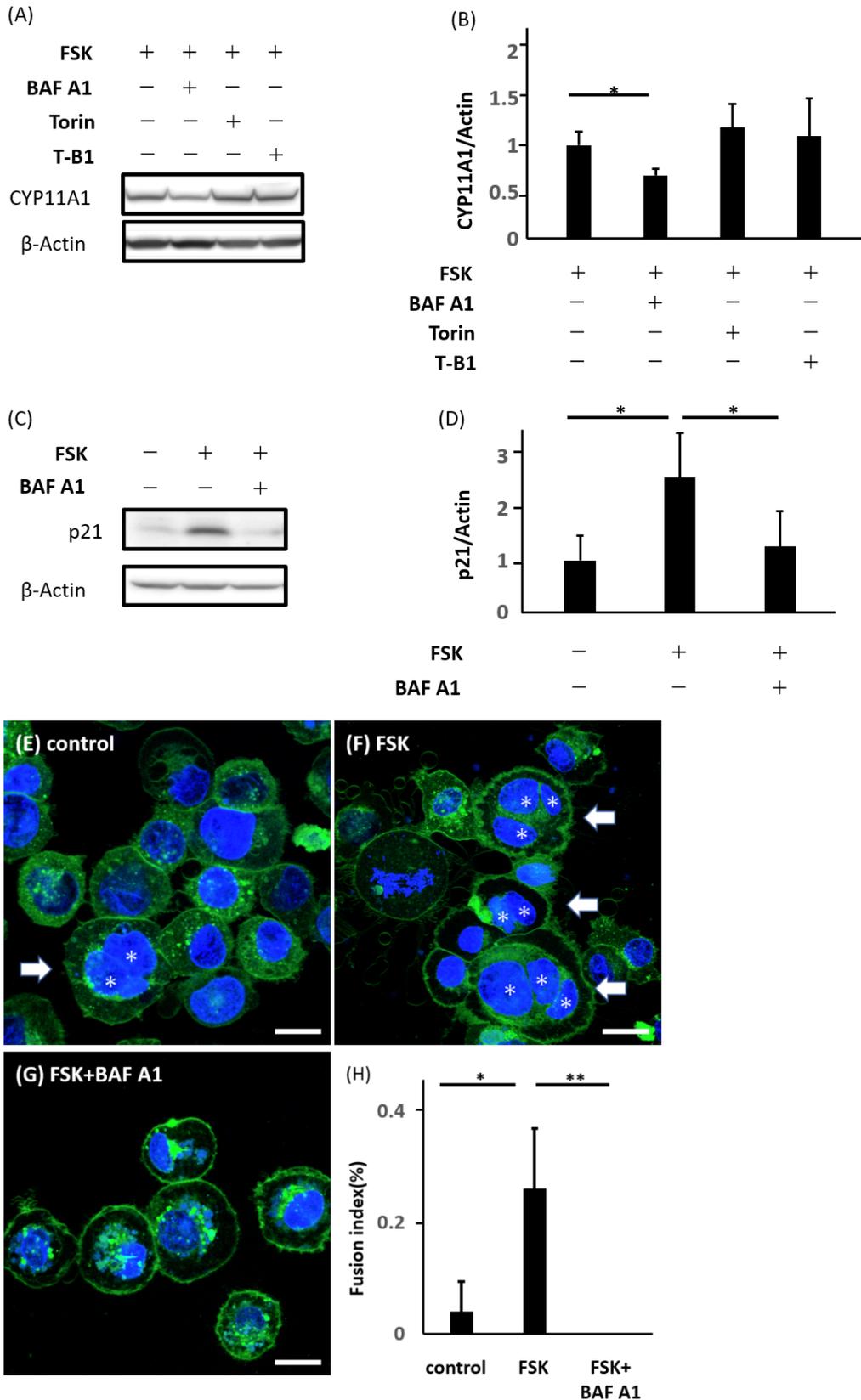
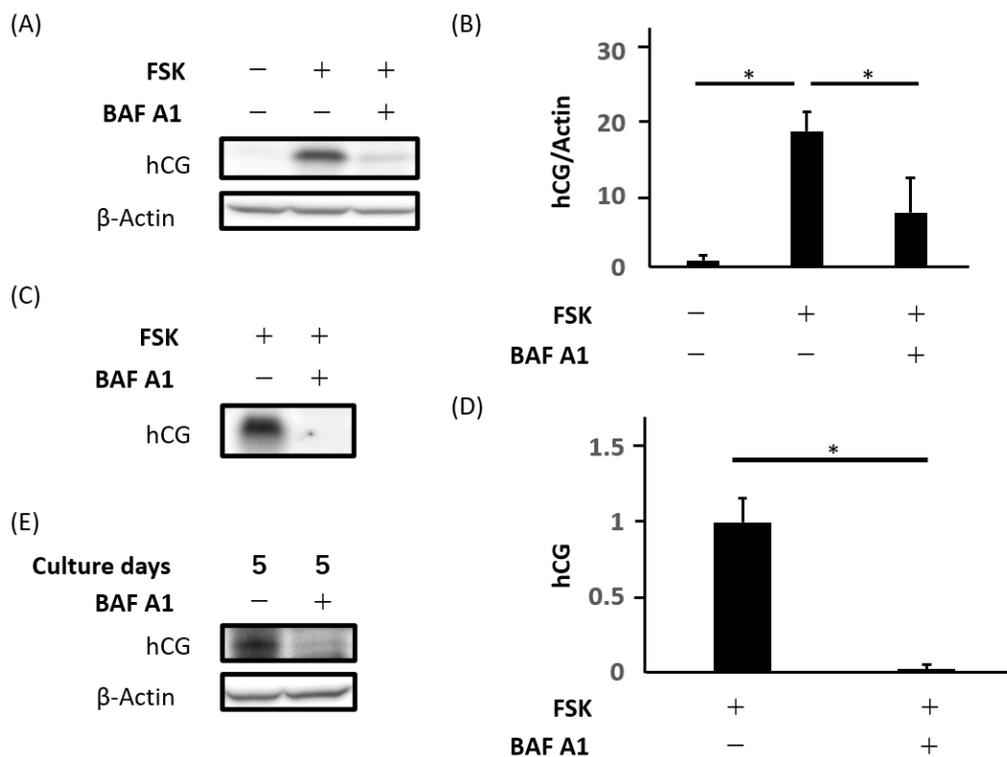


図3：オートファジー阻害によりBeWo細胞の分化・融合が阻害される

Forskolin (FSK) 存在下でオートファジー阻害剤であるBafilomycin A1 (BAF A1) 20nM, またはオートファジー活性化剤であるTorin1 10nMまたはTat-Beclin1 (T-B1) 20μMを投与した。(A,B) 合胞体化の指標として、CYP11A1のタンパク質発現を評価した。(C,D) BAF A1 20nMの存在下または非存在下において、FSKによって誘導される老化マーカーであるp21のタンパク質レベルを示した。細胞融合に関して共焦点顕微鏡を用いて評価を行った。(F) BeWo細胞をFSK 25μMで72時間処理して融合を促進し、(G) 同時にBAF A1でも処理した。細胞膜はDi-8-ANESS (緑)、核はDAPI (青)で染色した。融合細胞(矢印)は、複数の核(\*)を含んでいた。スケールバー: 20μm。(H) 融合指数は、融合した細胞核の数/全核数で算出した。ランダムに選択した6視野を撮影し、解析に使用した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。\*P < 0.05, および \*\*P < 0.01。



**図4 : パフィロマイシンA1 (BAF A1) は、合胞体形成時のhCG産生・分泌を抑制した**

BeWo細胞をフォルスコリン (FSK) 25μMとBAF A1 20nMで同時に処理し、細胞溶解液 (A,B) および培養液 (C,D) 中のhCGを評価した。上清中のタンパク質ローディング量はPonceau S染色を用いて確認した。(E) PHT細胞をBAF A1無添加の培地で72時間培養した後、BAF A1を20 nM添加した培地で48時間培養し、BAF A1存在下でのhCG産生を評価した。グラフは、3つの独立した結果から得られ、有意差検定を行った。\*P < 0.05。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
津田さやか, 中島彰俊, 齋藤 滋.	5章周産期感染症総論 妊娠母体の免疫学的変化.	藤井 知行 (総編集) / 永松 健 (編集協力)	分娩・産褥期の正常と異常 / 周産期感染症 <Science and Practice 産科婦人科臨床シリーズ3>	中山書店	東京	2021	246-259

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T., Okumura R., Nagano K., Minemura T., Izumi M., Motooka D., Nakamura S., Iida T., Maeda Y., Kumanogoh A., Tsutsumi Y., Takeda K.	Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	534	540-546	2021
Eto S., Koshida A., Tsujino H., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Silica particles with human protein corona shows sensitization potential in the human cell line activation test.	BPB Reports	5	1-4	2022
Eto S., Higashisaka K., Koshida A., Sato K., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y.	Amorphous silica nanoparticles exacerbate hepatic damage through the activation of acquired cell-mediated immunity.	Nano Express	3	015002	2022

東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央	微粒子曝露と脆弱な世代への健康影響～胎盤毒性/動態解析を例に～.	BIO Clinica	37	59-63	2022
Furuta A, Shima T, Kawaguchi M, Yamaki-Ushijima A, Higashisaka K, Cheng SB, Tsutsumi Y, Sharma S, Saito S, Nakashima A. et al.	The autophagy-lysosomal machinery enhances cytotrophoblast-syncytiotrophoblast fusion process.	Reprod. Med	-	-	2022 In press
Saito S, Nakashima A, Shima T, Tsuda S.	Pregnancy depends on a delicate balance of immune activation and regulation.	Explor Immunol.	1	461-478	2021
Banerjee S, Huang Z, Wang Z, Nakashima A, Saito S, Sharma S, Cheng S.	Etiological value of sterile inflammation in preeclampsia: Is it a non-infectious pregnancy complication?	Front Cell Infect Microbiol	11	694298	2021
Cheng S, Banerjee S, Daiello LA, Nakashima A, Jash S, Huang Z, Drake JD, Ernerudh J, Berg G, Padbury J, Saito S, Ott BR, Sharma S.	Novel blood test for early biomarkers of preeclampsia and Alzheimer's disease.	Sci Rep.	11	15934	2021
Yoneda N, Yoneda S, Tsuda S, Ito M, Shiozaki A, Niimi H, Yoshida T, Nakashima A, Saito S.	Pre-eclampsia Complicated With Maternal Renal Dysfunction Is Associated With Poor Neurological Development at 3 Years Old in Children Born Before 34 Weeks of Gestation.	Front Pediatr.	9	624323	2021

Tsuda S, Nakashima A, Morita K, Shima T, Yoneda S, Kishi H, Saito S.	The role of decidual regulatory T cells in the induction and maintenance of fetal antigen-specific tolerance: Imbalance between regulatory and cytotoxic T cells in pregnancy complications.	Hum Immunol.	82	346-352	2021
中島彰俊.	オートファジーと妊娠高血圧症候群	日本産科婦人科学会雑誌	73	1081-1088	2021
中島彰俊, 古田惇.	ヒト胎盤形成と異常.	HORM FRONT GYNECOL	28	187-192	2021
中島彰俊, 古田惇, 川口美保子.	オートファジー抑制と妊娠高血圧症候群発症の病態論.	産科と婦人科	89	162-168	2022

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について  
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年5月26日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 大阪大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 西尾章治郎

次の職員の(令和)3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築に関する研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 薬学研究科・教授  
(氏名・フリガナ) 堤 康央 (ツツミ ヤスオ)
- 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:動物の愛護及び管理に関する法律、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪大学	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について  
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年4月19日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人富山大学

所属研究機関長 職名 国立大学法人富山大学長

氏名 齋藤 滋

次の職員の(令和)3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築
- 研究者名 (所属部署・職名) 学術研究部医学系・教授  
(氏名・フリガナ) 中島 彰敏 (ナカシマ アキトシ)
- 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況 受講  未受講

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。