

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4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

令和5（2023）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	
「オートファジーが絨毛細胞の酸化ストレスに与える影響評価」	
に関する研究 -----	18
中島彰俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	28

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、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と言える。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、胎盤透過性、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、それら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旨とする。

令和4年度研究では、①医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子のマウス胎盤形成期における影響、②ヒト妊娠性絨毛がん細胞株（BeWo）における、銀ナノ粒子曝露による合胞体化の抑制には、cAMP/PKAシグナルの変動や酸化ストレスの産生が関与し得ること、③製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカが、BeWoにおけるCGBの遺伝子発現量を減少し、forskolin誘導性の合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを示した。さらに、④トランスウエルにおける胎盤関門モデルにおいて、サイトトロホブラスト層と比較し、シンシチオトロホブラスト層で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。また、⑤先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸のBeWoに対する曝露が、hCGの遺伝子発現量の増加やHIF-1 Pathwayの阻害、細胞内へのグルコース取り込みの抑制を引き起こし得ることを明らかとした。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、ナノマテリアルや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。本研究は、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ものと期待される。

研究分担者

中島彰俊・富山大学・学術研究部医学系・教授

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

A. 研究目的

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と言える。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、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、それら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(NM)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

銀ナノ粒子は、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)のものを使用した。なお、以後の検討で銀ナノ粒子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、原液の銀ナノ粒子と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、銀ナノ粒子分散液を培地で各濃度に希釈した。非晶質ナノシリカは、Micromod Partikeltechnologie 社(Germany)より購入した。非晶質ナノシリカは、一次粒子径が10 nm (nSP10、濃度:25 mg/mL)のものを使用した。非晶質ナノシリカについては、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE)による5分間の超音波処理を実施した。バルブロ酸(VPA)はWako(Osaka, Japan)より購入した。VPAはPBSに溶解させ実験に供した。

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は、JCRB細胞バンク(Japanese Collection of Research Bioresources; Osaka, Japan; JCRB9111)より購入した。BeWoの維持には、56℃で30分間の非働化処理を行った10%ウシ胎児血清(FBS; lot: 015BS427; Biological Industry; Beit Haemek, Israel)、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℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。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への影響については、Ham's F-12で終濃度50 μMに調製したforskolin(Cayman chemical, Ann Arbor, MI)溶液をBeWoに添加し48時間培養した。ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるJEG-3は、ATCC(HTB-36)より購入した。JEG-3の維持には、56℃で30分間の非働化処理を行った10% FBS(Biological Industry)、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DMEM(Wako)を用い、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。

3. 妊娠マウスへのnAg10単回投与の影響評価

雌性のBALB/c交配日確認マウスは、日本SLC(Shizuoka, Japan)より購入し実験に供した。マウスは、25 ± 2℃、各12時間の明暗サイクル環境下で飼育し、飲料水とMF(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)を常時与えた。また、本研究における実験動物の飼育および実験は、大阪大学薬学研究科三号館動物室にて行い、大阪大学動物実験規程に準じた。妊娠10.5日目のBALB/cマウスに、グルコース溶液またはnAg10(0.078、0.31、1.25 mg/kg)を尾静脈

より単回投与し、妊娠 15.5 日目に解剖を行い、胎仔重量および胎盤重量を測定した。

4. ATP および cAMP 産生変動評価

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。続けて、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 を各濃度に調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。ATP 濃度は CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega, Wisconsin, UK) を用いて、cAMP 濃度は cAMP-Glo Assay (Promega) を用いて解析した。

5. 細胞内活性酸素種 (ROS) 産生評価

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。続けて、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 (0.156 μg/mL)、H₂O₂ (100 μM) および N-acetylcysteine (NAC, 5 mM) を調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。その後、BeWo 細胞の核を Hoechst で、細胞内の ROS を CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により染色し、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ800, Keyence) で撮影した。

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 1.5×10^5 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% CO₂ 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. シンシチオトロホブラスト層の形成

ポアサイズ 0.4 μm、膜面積 0.3 cm² の Polyethylene terephthalate メンブレンを有するセルカルチャーインサートに 3.3×10^4

cells/well で JEG-3 を播種し、48 時間毎に培地を交換しながら、8 日から 12 日間培養した。この間、24 時間から 48 時間毎に 8 日から 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, Billerica, 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積算して細胞層の TEER 値 (ohms × cm²) とした。TEER 値がプラトーに達した後、DMEM および Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM; Takara Bio, Shiga, Japan) に終濃度 50 μM に調整した forskolin 溶液を apical 側に処置し TEER 値を 24 時間毎に測定しながら 72 時間培養した。

8. 傍細胞経路を介した物質の透過性評価

JEG-3 に Forskolin および EGM を処置し 72 時間培養後、終濃度 5 μM の Sodium fluorescein (Na-flu; Wako)、fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (Sigma-Aldrich) を添加し、0、1、3、6、24 時間後にサンプリングした。サンプルは蛍光光度計 (M1000; Tecan, Switzerland) により、excitation 475 nm、emission 500-550 nm の条件で蛍光強度を定量し、細胞層を介した見かけの物質透過係数 (P: apparent permeability coefficient) を算出した。

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

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。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への影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、ナノ粒子を各濃度に調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。シンシチオトロホブラストにおけるホルモン産生への影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo に添加し 24 時間培養することでシンシチオトロホブラストへの融合を誘導した。その後、バルプロ酸 (VPA) を各濃度に調製後、BeWo に 72 時間添加した。FastGene RNA Basic Kit (FastGene; 日本ジェネティクス; 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 Inc.; 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 (ニッポンジーン; 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 を実施した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin あるいは GAPDH 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。

10. Western Blotting による関連タンパク質の発現量評価

VPA がシンシチオトロホプラストにおける HIF-1α と GLUT1 の発現におよぼす影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo 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た。その後、各濃度に調製した VPA を BeWo に 72 時間添加した。タンパク質の回収は、細胞を PBS で洗浄し、RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM EDTA, Protease Phosphatase inhibitor (Thermo Fisher scientific, MA)) にて懸濁し、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、6xSDS sample buffer (0.375M Tris pH 6.8, 12% SDS, 60% glycerol, 0.6M DTT, 0.06% bromophenol blue) 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, Burlington, 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 Actin (Sigma-Aldrich)、ならびに、HIF-1α, GLUT1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 4°C で一晩反応させた。その後、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) により撮影した。

(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. nAg10 曝露が妊娠転帰におよぼす影響評価

本検討では、粒子径 10 nm の銀ナノ粒子 (nAg10) が胎盤形成や妊娠結果におよぼす影響を、妊娠マウスにより解析した (図 1A)。銀ナノ粒子の曝露経路としては、経肺 (吸入)、経皮、経口などが挙げられるが、我々のこれまでの取り組みを含め、いずれの経路からも吸収され全身分布し得ることが明らかとなっている。そこで本検討では、銀ナノ粒子のリスク解析に資するハザード同定を目的に、種々ルートからの吸収後の影響を直接的に評価するため、尾静脈内投与を選択した。まず、妊娠 10.5 日目での nAg10 投与により、顕著な母体体重変化は認められなかった (図 1B)。妊娠 15.5 日目に各マウスを解剖し、胎仔重量および胎盤重量を測定した。その結果、nAg10 投与群において胎仔重量に顕著な変動は認められなかったものの (図 1C)、胎盤重量は nAg10 (0.31 mg/kg mouse) 投与群において有意に低下した (図 1D)。従って、nAg10 が胎盤形成に対してハザードを呈することが示唆された。この点、nAg10 (1.25 mg/kg) 投与群では有意な変化は認められなかった。多胎動物の胎仔発育には胎仔数や胎盤への血流量などの要因が関与し、胎児数が減少すると胎児体重は増加することや、胎仔発育と胎盤重量は相関することが示唆されている。そのため、これら複合的な要因も相まって、nAg10 の投与量依存性が認められなかったものと考察している。今後、本結果について多角的な

視点から考察するうえで、胎盤や胎仔への nAg10 の移行量の解析や、複数回曝露による影響評価、さらには、胎盤形成・成熟について、病理解析や胎盤各層におけるマーカー分子の発現を評価することで、nAg10 が胎盤形成過程におよぼす影響を追究していくことが重要である。また、曝露実態を鑑み、経肺（吸入）、経皮、経口曝露後の胎盤形成や妊娠結果におよぼす影響についても検討していく予定である。

2. nAg10 曝露による合胞体化関連シグナル分子の変動解析

これまでに研究代表者らは、nAg10 が、forskolin により誘導される BeWo における合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを明らかとしてきた。胎盤形成期の合胞体化過程は、多数のシグナルから制御を受けることが報告されている。その中でも合胞体化促進に中心的に働く経路としては cAMP/PKA シグナルが最も一般的に知られており、実際のヒト胎盤形成過程では妊娠初期に産生増大する hCG がそのレセプターである LHCGR に結合後、アデニル酸シクラーゼの活性化を介して ATP を cAMP へと変換することで下流シグナルを活性化し合胞体化が進行する。そこで、nAg10 曝露による BeWo 細胞内での ATP 濃度の測定を試みると共に、ATP から変換され合胞体化に必須の因子である cAMP の細胞内濃度の測定を実施した。ATP 濃度は nAg10 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加により有意に低下することが示された (図 2A)。続けて、細胞内 cAMP 濃度の測定を実施したところ、forskolin 単独処置群において濃度上昇が示された一方で、nAg10 共処置時には添加濃度依存的な濃度上昇が示された (図 2B)。nAg10 による ATP 産生の低下が誘導されたことから、ATP の変換により産生される細胞内 cAMP 濃度も低下すると考えていたが、予想に反し cAMP 濃度の上昇が示された。本結果において、forskolin 単独群と比較した際の nAg10 処置による cAMP 濃度の上昇は、nAg10 が p38 MAPK 経路や mTOR 経路などの合胞体化関連経路に変動をおよぼし合胞体化を抑制した結果に対して、代償的に上昇している可能性が考えられる。

3. nAg10 曝露による合胞体化抑制における酸化ストレスの関与

nAg10 処置時に ATP 濃度の減少が認められたこと、細胞内における主要な活性酸素種 (ROS)

の産生場所が ATP 合成と同じミトコンドリアであることを踏まえ、forskolin と nAg10 を共処置した際の細胞内での ROS 産生を評価することとした。ROS 存在下で蛍光を発する試薬である CM-H₂DCFDA を用いて ROS 産生を評価したところ、forskolin-nAg10 共処置群において強い蛍光が観察された。このとき nAg10 とともに抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を処置した群では蛍光が観察されなかったことから、nAg10 による ROS 産生を示した (図 3)。

続けて、nAg10 による ROS 産生が合胞体化の進行におよぼす影響を評価するために、合胞体化マーカーである CGB ならびに合胞体化促進分子である *ERVFRD-1* の発現変動を RT-PCR により解析した。その結果、NAC 処置により nAg10 誘導性の合胞体化抑制が緩和される結果が得られた (図 4)。一方で NAC 5 mM を処置した群では、NAC による発現抑制の緩和は認められなかった。この点、NAC がミトコンドリアの酸化を誘導しシトクロム c の放出を促進することが報告されており、nAg10 と NAC の共処置によりミトコンドリア障害が増悪した可能性も考えられる。以上の結果を総合すると、nAg10 は合胞体化過程において ROS 産生を誘導することで、合胞体化の抑制に関与する可能性が示された。一方で今回観察した ROS が、nAg10 がミトコンドリアに変動を与えた結果として産生された ROS なのか、それとも別の経路で産生誘導された ROS がミトコンドリアに障害を与えたのかについては検討できていない。今後は、細胞内でのミトコンドリアへの移行性ならびにミトコンドリア ROS の産生について検討を進めることで、nAg10 による合胞体化抑制の機序解明を期待する。

4. nSP10 曝露が合胞体化関連遺伝子の発現に与える影響

本検討では、NM 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 NM 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、胎盤ホルモン産生に着目し NM の生体影響評価を試みた。NM のモデルとしては、製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカを実験に供した。はじめに、非晶質ナノシリカ曝露における胎盤ホルモン産生への影響を検討するため、未分化の BeWo に forskolin を処置し、その後、粒子径 10 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10) を 72 時間処置した際のヒト絨毛性ゴナドトロピン β

(hCG, gene name; *CGB*) の遺伝子発現量を real-time RT-PCR により解析した。なお、作用濃度に対して細胞障害性が認められないことを確認している (図 5A)。解析の結果、nSP10 曝露群において、対照群と比較し、*CGB* の発現量に有意な変動は認められなかった (図 5B)。一方で、未分化の BeWo に forskolin と nSP10 を共処置した際には、nSP10 の作用濃度に対する細胞障害性は認められず (図 5C)、また、*CGB* の mRNA の発現量は、forskolin 単独処置群と比較して、nAg10 50 µg/mL 共処置により有意に発現量が減少することが明らかとなった (図 5D)。

そこで、nSP10 が合胞体化におよぼす影響を評価するため、合胞体化の進行に伴い血管新生シグナルの伝達に関わる分子である Syndecan-1 (gene name; *SDC1*)、および、合胞体化の促進に関与する分子である Syncytin-2 (gene name; *ERVFRD*) の発現量を評価した。その結果、forskolin 添加群と比較して、nSP10 (50 µg/mL) 共処置群において、各 mRNA の発現が有意に抑制されることが示された (図 6)。以上の結果から、形態学的な解析等が必要であるものの、nSP10 が BeWo において、forskolin により誘導される合胞体栄養膜細胞の形成を抑制することが示唆された。今後は、nSP10 曝露により合胞体化の誘導が抑制される機序解明を進めると共に、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、並行して検討を進めることで、NM が胎盤形成・成熟過程におよぼす影響について理解を深めていく。

5. シンシチオトロホブラスト層に着目した胎盤透過性評価系の構築に向けた検討

我々は、日々様々な化学物質に曝露しており、胎児もまた、それら化学物質に曝露することで、先天性異常や胎児毒性等のリスクが懸念される。化学物質の胎児に対するリスクを把握するにあたって、母親が曝露した化学物質は胎盤を透過し、胎児へ移行することから、胎盤における動態情報が求められる。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。胎盤関門はサイトトロホブラスト層 (CT 層) と、CT 層が合胞体化し形成されるシンシチオトロホブラスト層 (ST 層) の 2 層から構成されているが、汎用されている *in vitro* モデルでは CT 層のみのものが一般的であ

り ST 層を考慮したものは少ない。一方で、CT 層と ST 層では細胞間結合に関わる分子やトランスポーターの発現が異なることが知られていることから、両層の透過性は異なると考えられる。そこで本検討では、CT 層と ST 層の比較解析を通じて、ST 層の透過性の理解を深めることを目指す。

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 を播種し、経時的に TEER 値を測定したところ、8 日目時点において TEER がプラトーに達したと判断し、forskolin および EGM を処置した。その後 72 時間培養した層において TEER は Nontreated (N.T.) 群、forskolin (Frk) 群、Frk+EGM 群の順に小さくなっていった (図 7A)。この時、合胞体化マーカーである *CGB* の発現を real-time RT-PCR で評価したところ、Frk 群において最も大きく上昇しており、合胞体化が亢進していることが示唆された (図 7B)。この時、Sodium fluorescein (Na-Flu; 図 8A)、分子量 4 kDa の FITC-dextran (FD-4; 図 8B)、分子量 40 kDa の FITC-dextran (FD-40; 図 8C) の透過性を評価したところ、いずれにおいても N.T. 群、Frk 群、Frk+EGM 群の順に大きくなることが示され、TEER の結果と合わせて考察すると、N.T. 群、Frk 群、Frk+EGM 群の順で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。今後は、CT 層および ST 層におけるトランスポーターの発現量を解析すると共に、それらトランスポーターを介した化学物質の輸送能等について評価することで、CT 層と ST 層の比較を進める。

6. バルプロ酸が胎盤のホルモン産生におよぼす影響評価

近年の科学技術の発展に伴い、ヒトは様々な化学物質への曝露を避け得ない。中でも、妊娠期における化学物質曝露は母親のみならず、胎児への影響も懸念され、化学物質の発生毒性評価が求められる。現在、発生毒性評価は胎児に着目した *in vivo* 試験法が存在するが、発生毒性においては毒性発現部位が母体・胎盤・胎児と複数存在する。なかでも胎盤については、妊娠期において胎児が酸素供給や器官形成が依存する場所であり、胎盤機能に障害が生じると流産・早産や胎児毒性にも影響が生じることが想像に難くない。従って、従来の「化学物質の胎児への毒性」のみならず、「化学物質の胎盤への毒性」を評価することで、正確な発生毒性評価につながると考えられる。胎盤は

妊娠維持に必須の器官であり、hCG、ヒト胎盤性ラクトゲン (hPL、gene name ; *CSH1*) など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。これらホルモンのレベル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繋がり得る。そこで本研究では、化学物質が妊娠期における胎盤ホルモンへおよぼす影響評価系を構築することで、「胎盤への毒性を評価する系」の確立を目指す。

これまでに研究代表者らは、先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸 (VPA) が BeWo において、hCG の発現上昇、ならびに、hPL の発現減少を引き起こすことを見出してきた。本年度は、VPA による胎盤ホルモン変動機序の解明を試みた。まず、VPA を添加した BeWo について、網羅的な遺伝子発現変動解析 (RNA-seq) を実施した (図 9A)。遺伝子発現データを用いて、Pathway 解析を実施したところ、VPA 添加により発現減少した遺伝子群の Pathway 候補として、HIF-1 Pathway 遺伝子群を抽出できた (図 9B)。そこで、VPA を添加した際の HIF-1 α の発現量を解析したところ、HIF-1 α の発現が経時的に減少することが示された (図 10A)。また、RT-PCR により、HIF-1 の下流遺伝子 (*ADM*、*HK2*、*FOS*) の発現量がいずれも VPA 添加により減少することが認められた (図 10B)。従って、VPA が HIF-1 Pathway を阻害し得ることが示された。

さらに、HIF-1 Pathway の阻害が胎盤機能へおよぼす影響を評価するため、HIF-1 下流分子の 1 つであり、胎盤機能と密接に関連する GLUT1 に着目した。GLUT1 は胎盤における主要なグルコーストランスポーターであり、胎盤から胎児へのグルコース供給機能を担う重要な分子である。胎児はグルコースの供給を完全に母体に依存しており、胎盤からのグルコース供給不全が起きると胎児の発育に負の影響をおよぼすことが報告されている。そこで、BeWo に VPA を添加した際の GLUT1 の発現量を Western Blotting により解析したところ、VPA の添加濃度依存的に発現量が減少することが示された (図 11A)。また、GLUT1 の発現量が減少したことを受け、BeWo におけるグルコース取込量を、蛍光グルコースを用いて評価したところ、VPA 添加群において BeWo へのグルコースの取り込み量が抑制されることが示された (図 11B)。今後は、VPA による胎盤ホルモンの変動、HIF-1 Pathway の阻害、胎盤

におけるグルコース取り込み能との連関を追究すると共に、*in vivo* で VPA を投与した際に、*in vitro* の結果との相関性を検証していくことで、VPA による胎盤毒性の発現機序解明を目指す。

E. 結論

本年度は、①医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子のマウス胎盤形成期における影響、②ヒト妊娠性絨毛がん細胞株である BeWo における、銀ナノ粒子曝露による合胞体化の抑制には、cAMP/PKA シグナルの変動や酸化ストレスの産生が関与し得ること、③製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカが、BeWo における hCG の遺伝子発現量を減少し、forskolin により誘導される合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを示した。さらに、④トランスウェルにおける胎盤関門モデルの作成において、サイトトロホブラスト層と比較し、シンシチオトロホブラスト層で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。また、⑤先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸の BeWo に対する曝露が、hCG の遺伝子発現量の増加や HIF-1 Pathway の阻害、細胞内へのグルコース取り込みの抑制を引き起こし得ることを明らかとした。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、NM や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、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. Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppress retinoic acid-induced neuronal differentiation in human-derived neuroblastoma SH-SY5Y cells., ACS Appl. Nano Mater., 5: 19025-34, 2022.
2. Sakahashi Y., Yamamoto R., Kitahara G., Izutani R., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles decrease human chorionic gonadotropin β expression during syncytialization of BeWo cell., BPB Reports, 5(6): 154-8, 2022.
3. Sakahashi Y., Higashisaka K., Isaka R., Izutani R., Seo J., Furuta A., Yamaki-Ushijima A., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppressed forskolin-induced syncytialization in BeWo cells., Nanotoxicology, 16(9-10): 883-94, 2022.

【総説・その他】

1. Higashisaka K. : Health effects and safety assurance of nanoparticles in vulnerable generations., Biol. Pharm. Bull., 45(7): 806-12, 2022.
2. 東阪和馬, 山下琢矢 : 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～. Yakugaku Zasshi. 143(2): 119-20,

2023.

3. 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. Yakugaku Zasshi. 143(2): 133-8, 2023.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬 : 食品中ナノマテリアルの安全性評価 : 安全なナノマテリアルの創製に向けた脳神経機能への影響評価., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 7 月. (シンポジウム : 食品安全に資する食品・食品添加物の健康影響評価と品質評価法の基盤開発)
2. 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性評価について. 第 24 回医薬品品質フォーラムシンポジウム, 東京 (東京), 2023 年 2 月. (シンポジウム : 欧州での食品添加物としての二酸化チタンの使用停止と医薬品規制への波及)
3. 東阪和馬 : ナノ粒子による胎盤毒性と次世代への影響., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月. (シンポジウム : 微粒子疾患の発症に関わる生体機構の解明と制御法開発)
4. 堤 康央, 辻野博文, 浅原時泰, 東阪和馬, 芳賀優弥 : はじめに ～生体外微粒子としてのナノ・マイクロプラスチックの生体影響評価～., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
5. 堤 康央, 芳賀優弥, 東阪和馬, 浅原時泰, 辻野博文 : 終わりに ～薬学的観点からのナノ・マイクロプラスチックの安全性評価～., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 小椋万生, 衛藤舜一, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカの鼻腔を介した吸入曝露が免疫系におよぼす影響の評価., 日本薬剤学会第 37 年会, オンライン, 2022 年 5 月.
2. 東阪和馬, 衛藤舜一, 小椋万生, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品中ナノマテリアルの安全性評価 : 獲得免疫系を介した非晶質ナノシリカのハザード解析とそ

- の発現機序解明., 第 47 回日本香粧品学会., 東京 (東京), 2022 年 6 月.
3. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 環境中のマイクロプラスチックの劣化状態を考慮した細胞毒性評価., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 6 月.
 4. 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: 活性酸素種の誘導を介した銀ナノ粒子による胎盤合胞体化の抑制., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 6 月.
 5. 東阪和馬, 坂橋優治, 北原 剛, 泉谷里奈, 小林純大, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノ粒子が胎盤細胞の合胞体化におよぼす影響評価., フォーラム 2022., 熊本 (熊本), 2022 年 8 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: 胎盤形成段階の細胞合胞体化に着目したナノマテリアルの影響評価., 第 21 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフォーラム 2022., 名古屋 (愛知), 2022 年 9 月.
 7. 北原 剛, 東阪和馬, 坂橋優治, 泉谷里奈, 小林純大, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 奥野和香子, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: バルブロ酸による胎盤ホルモンが攪乱するメカニズム解明., 第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会., 枚方 (大阪), 2022 年 10 月.
 8. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 環境中の表面性状を模擬したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明., 第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会., 枚方 (大阪), 2022 年 10 月.
 9. 小林純大, 東阪和馬, 奥野和香子, 坂橋優治, 北原 剛, 泉谷里奈, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 野村鉄也, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 堤 康央: シンシチオトロホプラスチック層に着目した化学物質の胎盤透過性評価に適用 in vitro モデル系の構築に向けた研究., 日本薬物動態学会第 37 年会., 横浜 (神奈川), 2022 年 11 月.
 10. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
 11. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 表面劣化したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
 12. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによる妊娠転帰への影響と炎症応答との関連追究., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.

【国際学会発表】

1. Higashisaka K., Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Safety evaluation of nanomaterials as a pharmaceutical base material: Hazard analysis of silver nanoparticles focusing on cranial nerve function, CRS 2022 Annual Meeting, Montreal (Canada), 11-15 July, 2022.
2. Haga Y., Okumura M., Konishi H., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Dynamics of amorphous silica nanoparticle in neural cell and microglia cell, CRS 2022 Annual Meeting, Montreal (Canada), 11-15 July, 2022.
3. Higashisaka K., Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppressed retinoic acid-induced neuronal differentiation in SH-SY5Y cells., The XVIth International Congress of Toxicology, Maastricht (Netherlands), 18-21 September, 2022.
4. Sakahashi Y., Higashisaka K., Izutani R., Seo J., Kitahara G., Kobayashi J., Nakamoto Y., Yamamoto R., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles inhibit intercellular fusion in the BeWo syncytialization process.,

The XVIth International Congress of Toxicology, Maastricht (Netherlands), 18-21 September, 2022.

5. Higashisaka K., Eto S., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Hazard analysis of amorphous silica nanoparticle via acquired immune system., AAPS 2022 PharmSci 360, Boston (USA), 16-19 October, 2022.

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

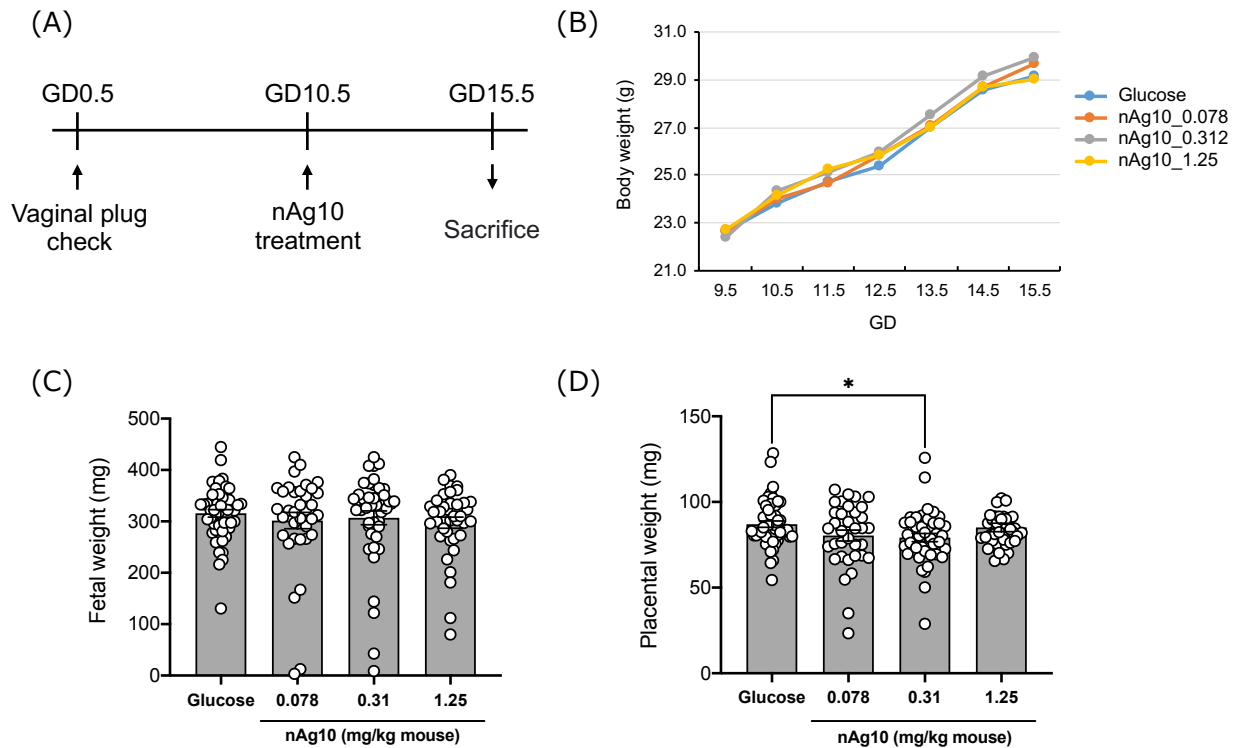


図1：妊娠マウスへのnAg10単回投与の影響評価

(A) 妊娠10.5日目のBALB/cCrSlcマウスに、グルコース溶液またはnAg10 (0.078, 0.3125, 1.25 mg/kg mouse) を単回尾静脈投与した。妊娠15.5日目に麻酔下で解剖を実施し、(B) 母体体重、(C) 胎仔重量、および、(D) 胎盤重量を測定した。The results presented here are pooled from two independent experiments. Glucose; n = 53, nAg10-0.078; n = 35, nAg10-0.312; n = 43, nAg10-1.25; n = 38. Data are presented as means \pm S.D.; * P < 0.05.

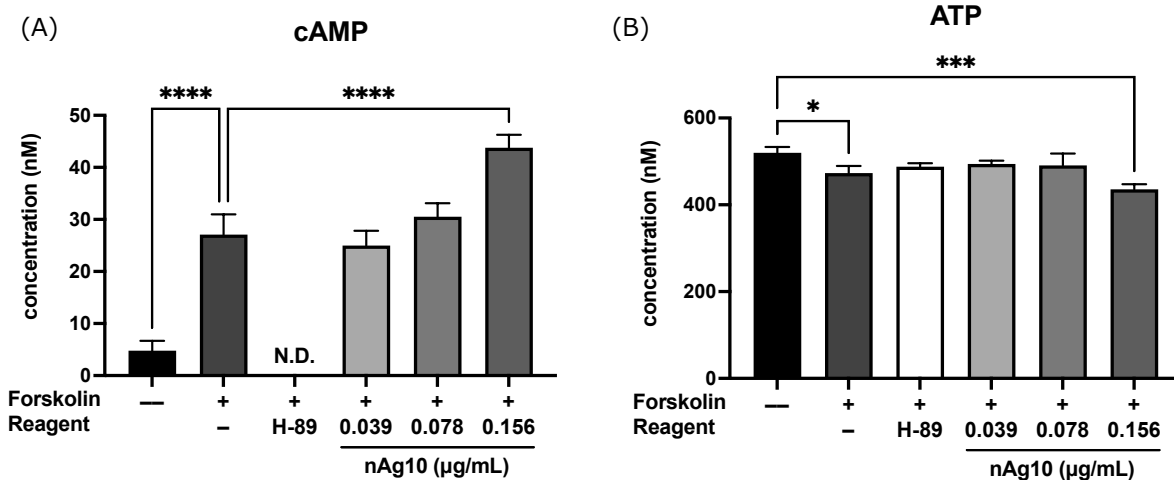


図2：nAg10処置時のATPおよびcAMP産生変動

未分化のBeWoに、nAg10を0, 0.039, 0.078, 0.156 μ g/mLの濃度で50 μ M forskolinとともに処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μ M) の共処置群を設定した。48時間後に、cAMP-Glo AssayまたはCellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assayを用いて、(A) cAMP濃度および(B) ATP濃度を測定した。Data are presented as means \pm S.D. of three independent experiments; * P < 0.05, *** P < 0.001, **** P < 0.0001. N.D.; Not Detected.

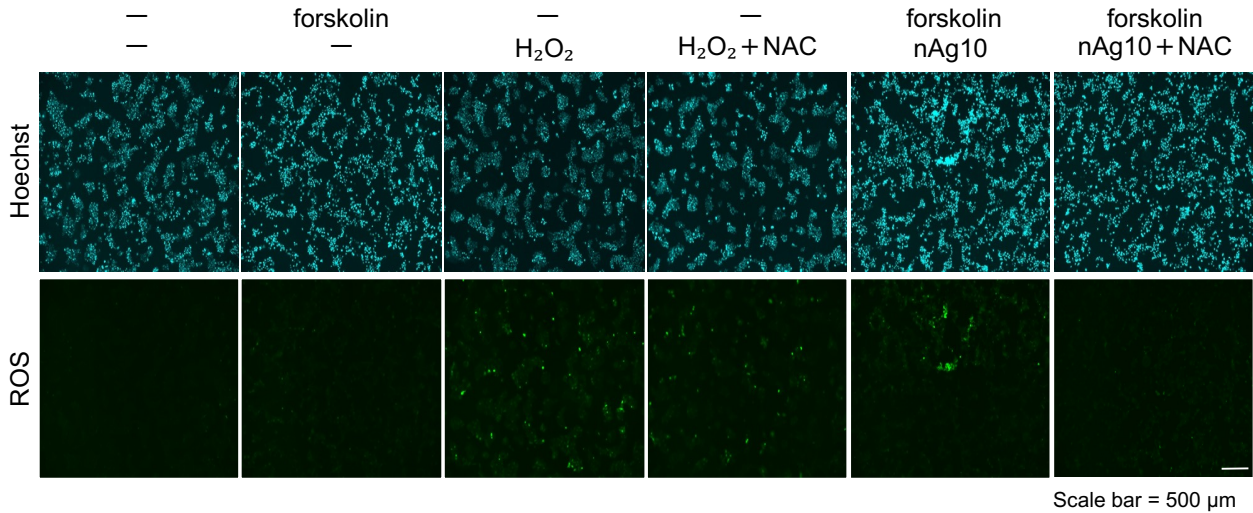


図3 : nAg10処置時の細胞内ROS産生評価

未分化のBeWoに、nAg10を0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で50 μM forskolinとともに処置した。またROS産生の対照群として、 H_2O_2 (100 μM) 処置群を設定した。抗酸化剤としては、N-アセチルシステイン (NAC; 5mM) を処置した。各種試薬添加の48時間後に、BeWo細胞の核を Hoechst (Cyan : 上段) で細胞内のROSを CM- H_2DCFDA (green : 下段) を用いて検出した。

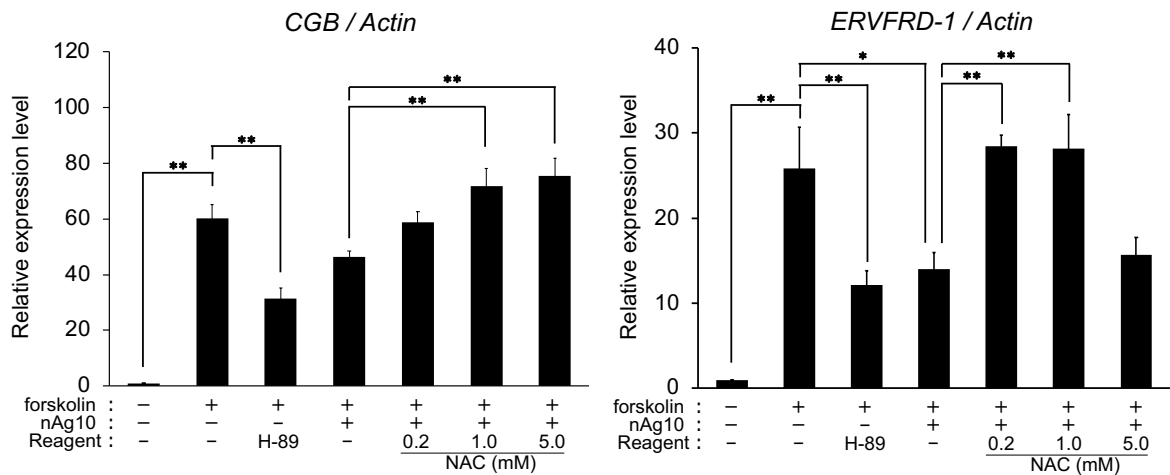


図4 : nAg10とNACの共処置時の合胞体化関連遺伝子の発現評価

未分化のBeWoに、nAg10を 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で50 μM forskolinとともに処置した。このとき、forskolin、nAg10とともに、抗酸化剤NACを0.2、1.0、5.0 mMの濃度で共処置した群を設定した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μM) の共処置群を設定した。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。Data are presented as mean \pm SD (n=3) . * P < 0.05, ** P < 0.01.

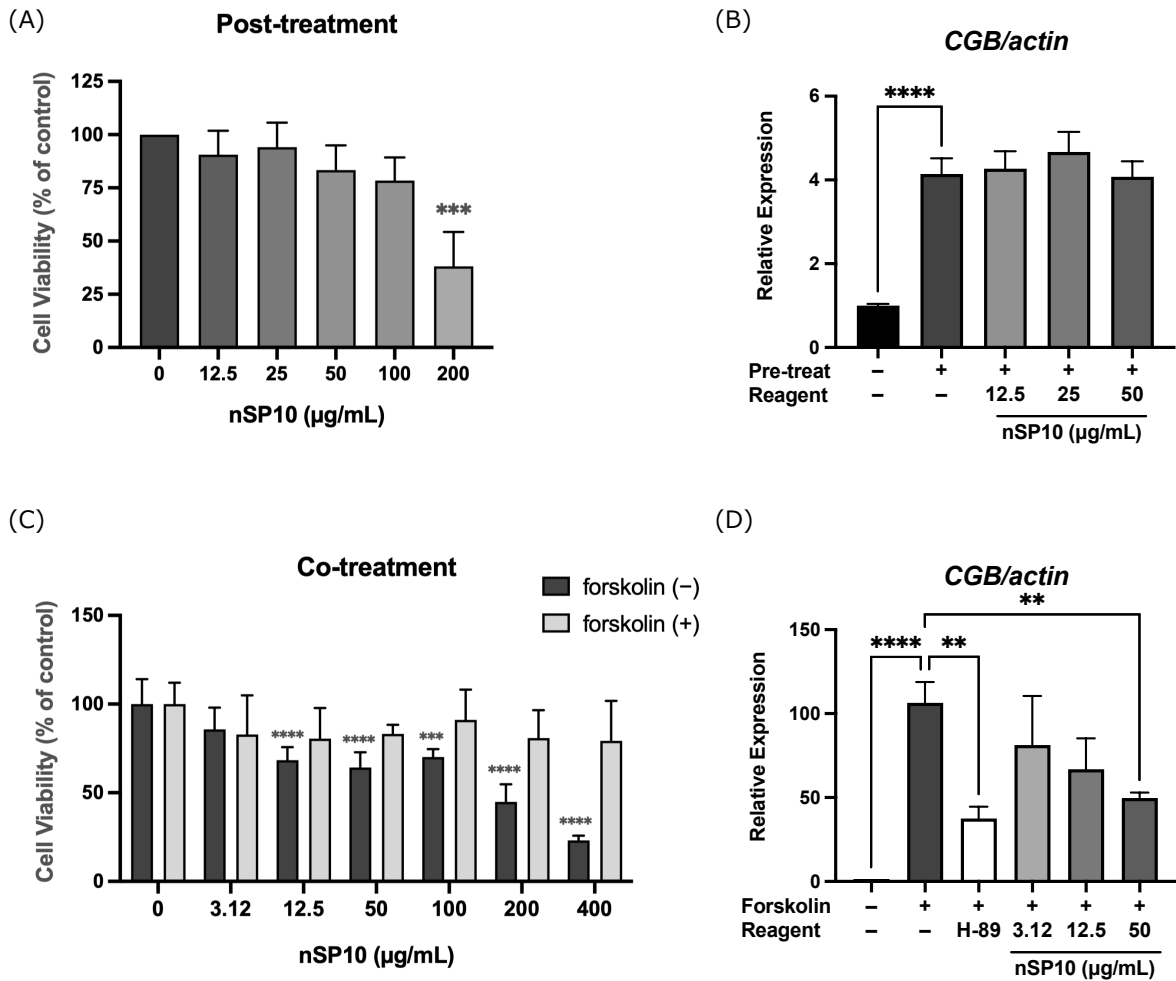


図5 : nSP10による細胞障害性とCGBの発現変動評価

(上段) 未分化のBeWoに、50 μM forskolinを24時間処置した後、nSP10を各濃度で72時間処置した。(下段) 未分化のBeWoに、nSP10を各濃度で50 μM forskolinとともに48時間処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μM) の共処置群を設定した。その後、(A、C) MTTアッセイにより細胞障害性を評価すると共に、(B、D) 細胞からRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供し、CGBの発現量を解析した。各群のmRNA発現量は、β-Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean ± SD (n=3) . ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

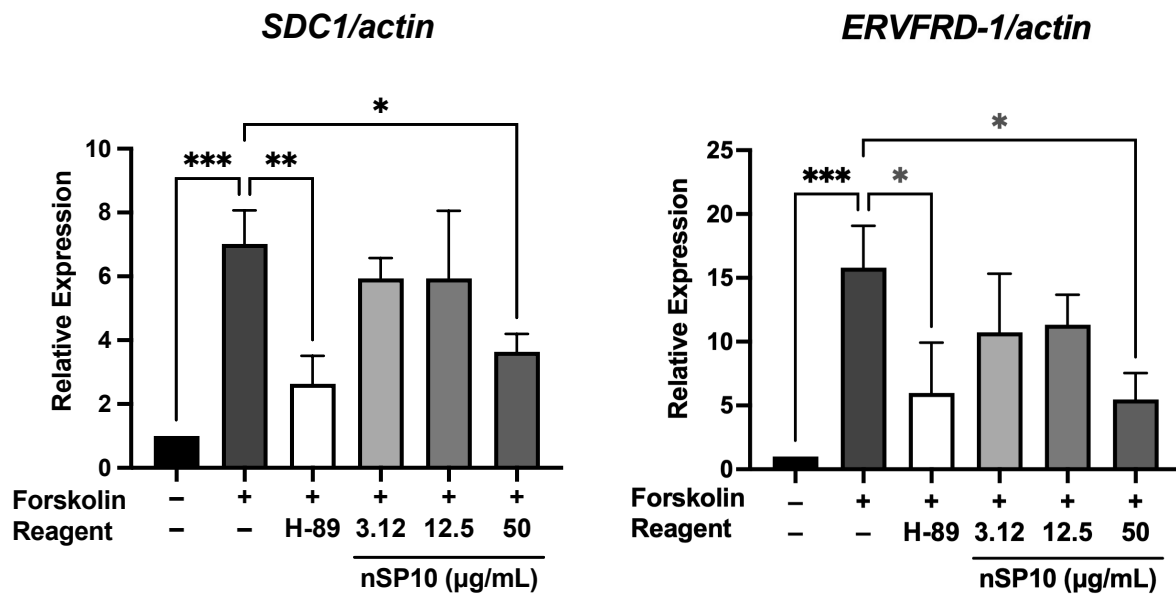


図6 : nSP10処置時の合胞体化関連遺伝子の発現評価

未分化のBeWoに、nSP10を 0、3.12、12.5、50 µg/mLの濃度で50 µM forskolinとともに処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 µM) の共処置群を設定した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。Data are presented as mean ± SD (n=3) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

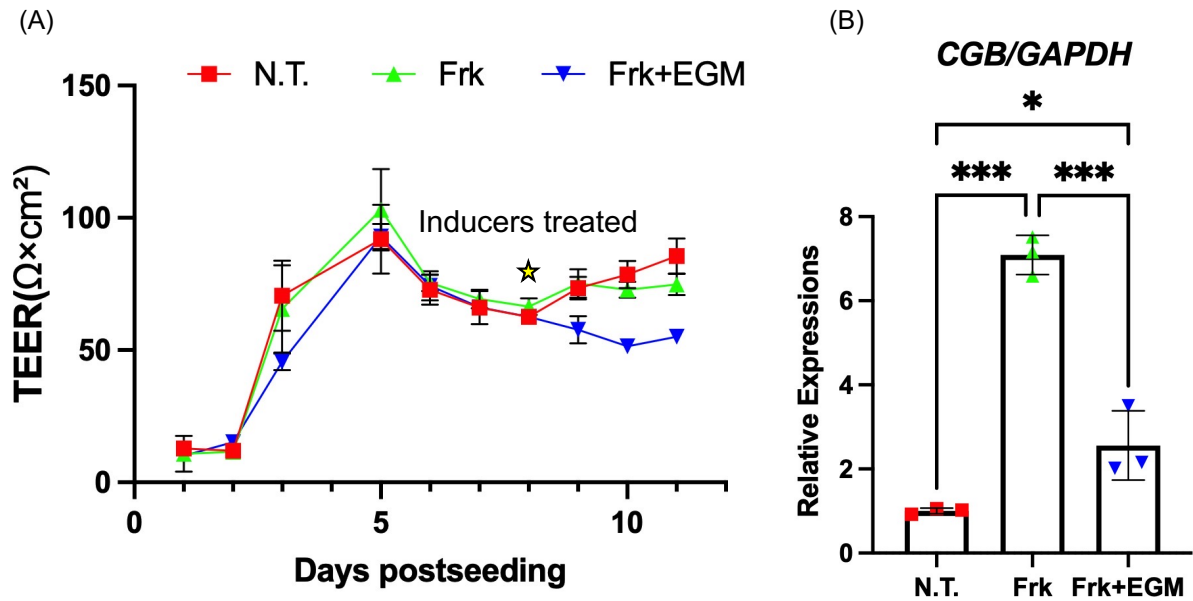


図7：胎盤関門構築とST層形成

(A) JEG-3をセルカルチャーインサートに播種し、24時間から48時間毎に12日間TEER値を測定した。播種後8日目の時点でForskolin (Frk) 及びEGMを処置し72時間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、24時間から48時間毎に8日から12日間抵抗値を測定した。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積算して細胞層のTEER値 (ohms × cm²) とした。(B) Forskolin及びEGMを処置し72時間培養後、細胞を回収し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、GAPDH標準化することで比較した。Data are presented as mean ± SD (n = 3). *P < 0.05, ***P < 0.001.

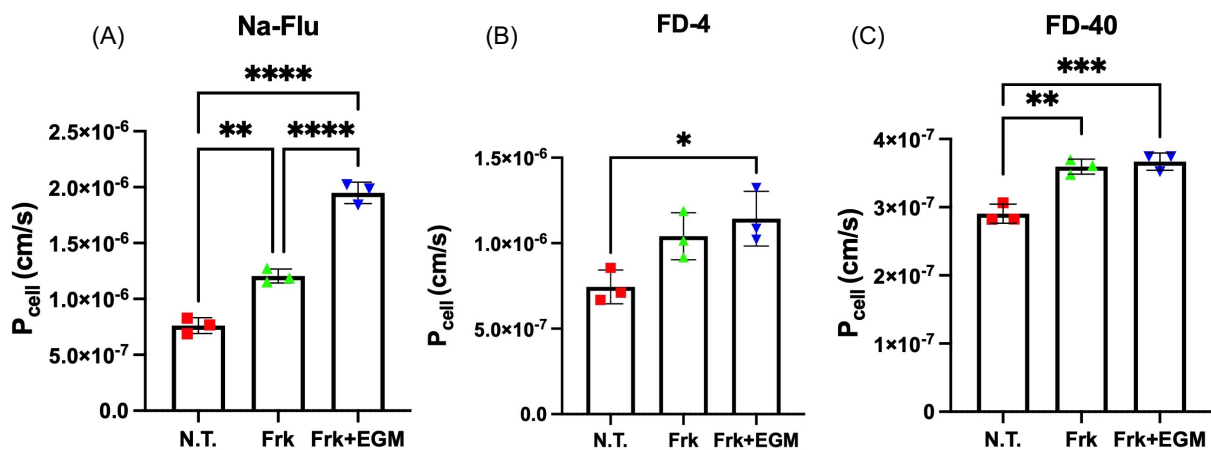


図8：モデル化合物の透過性評価

JEG-3にForskolin及びEGMを処置し72時間培養後、終濃度5 μMの (A) Sodium fluorescein (Na-Flu)、(B) 分子量4 kDaのFITC-dextran (FD-4)、(C) 分子量40 kDaのFITC-dextran (FD-40) を添加し、0、1、3、6、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した。また、細胞層を介した見かけの物質透過係数 (P: apparent permeability coefficient) は下式より計算した。Data are presented as mean ± SD (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

$$1/P_{total} = 1/P_{cell} + 1/P_{membrane}$$

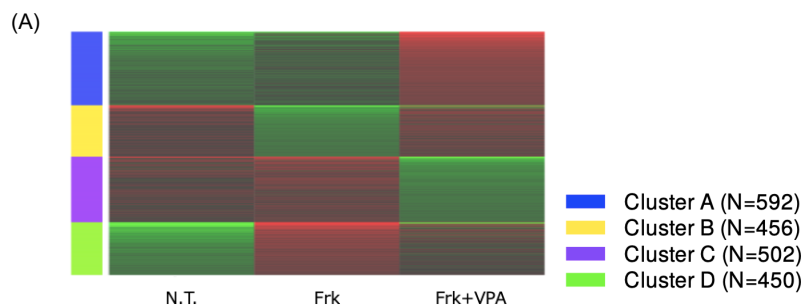
$$P = Q/(dC \times A \times t)$$

Q = the amount transported (mol)

dC = the difference in concentration between side A and side B (mol/L)

A = the area of the insert (cm²)

t = times (s)



(B) Frk処置により発現上昇・バルプロ酸添加により発現減少した遺伝子群のPathway

	Term	q-value
1	HIF-1 transcriptional activity in hypoxia	7.42E-06
2	Interleukin-2 signaling pathway	2.33E-05
3	BDNF signaling pathway	3.46E-05
4	EGFR1 pathway	1.26E-04
5	Interleukin-4 regulation of apoptosis	1.29E-04
6	Gastrin pathway	3.79E-04
7	Oncostatin M	0.00321
8	TSH regulation of gene expression	0.00321
9	FSH regulation of apoptosis	0.00324
10	Hormone ligand-binding G-protein coupled receptors	0.00417

Frk処置により発現減少・バルプロ酸添加により発現上昇した遺伝子群のPathway

	Term	q-value
1	Transmembrane transport of small molecules	0.120
2	Amino acid biosynthesis and interconversion	0.120
3	Amino acid transport across the plasma membrane	0.123
4	Transport of inorganic cations/anions and amino acids	0.148
5	Amino acid metabolism	0.148
6	SLC-mediated transmembrane transport	0.148
7	Small cell lung cancer	0.244
8	Integrin-linked kinase signaling	0.259
9	Stress induction of HSP regulation	0.284
10	Amino acid and oligopeptide SLC transporters	0.284

図9 : VPA曝露後のBeWoにおける発現変動遺伝子の網羅的な解析

未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPA (0.6 mM) を72時間添加した。細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、RNA-Seqに供した。(A) FPKM 0.5以上かつ、発現変動した上位2000個の遺伝子を用いてクラスター分類を行った後に(緑; 低発現、赤; 高発現)、(B) クラスターB、Dに対してPathway解析を実施した。

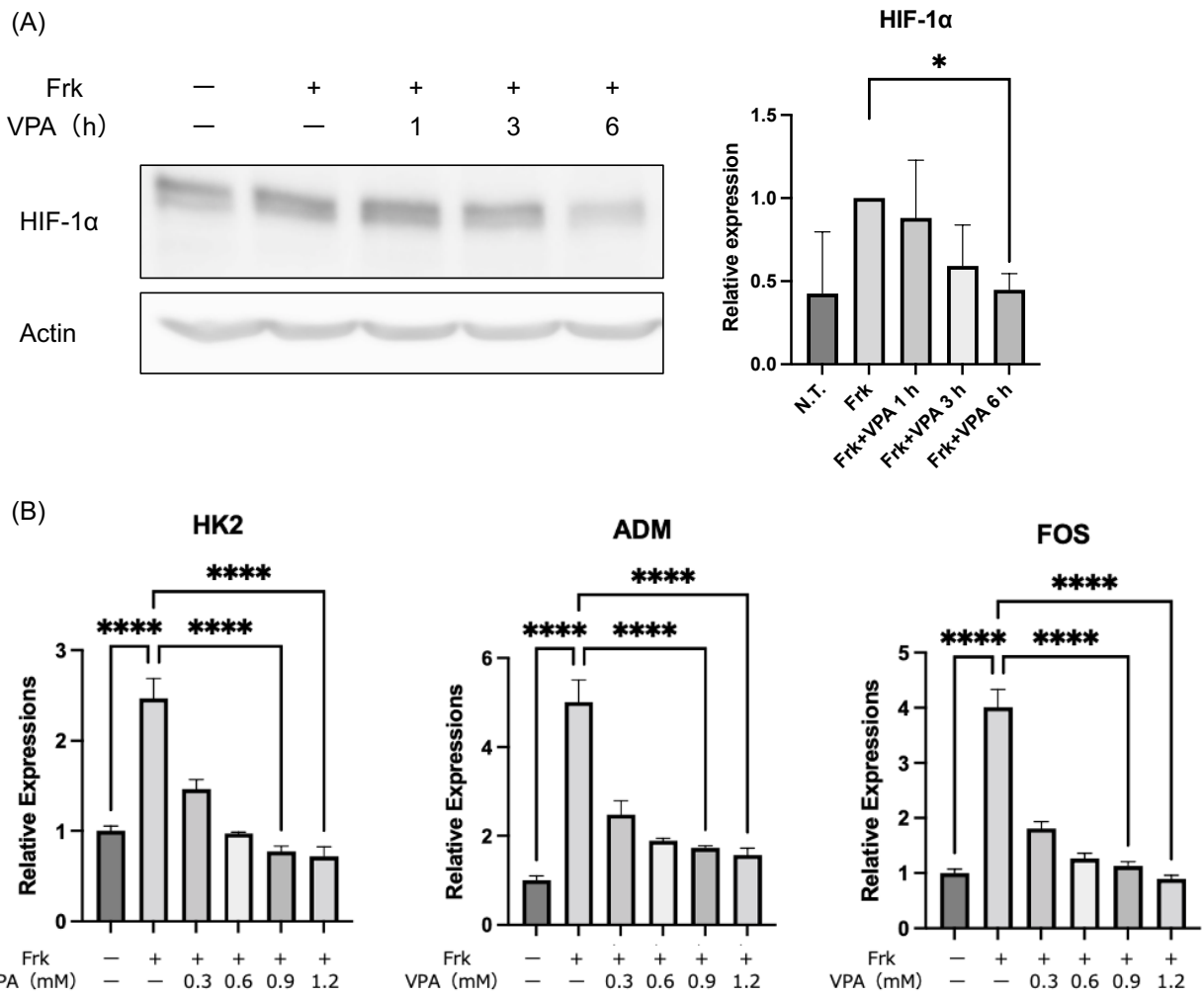


図10 : VPAによるHIF-1α、および、HIF-1下流遺伝子の変動評価

未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPA (0.6 mM) を1、3、6時間で経時的に添加した。(A) 細胞を回収しタンパク質を抽出、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、HIF-1αの発現量を解析した。(B) 未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPAを72時間添加し、RNAを抽出した。各群のmRNA発現量は、GAPDHで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, **** P < 0.0001.

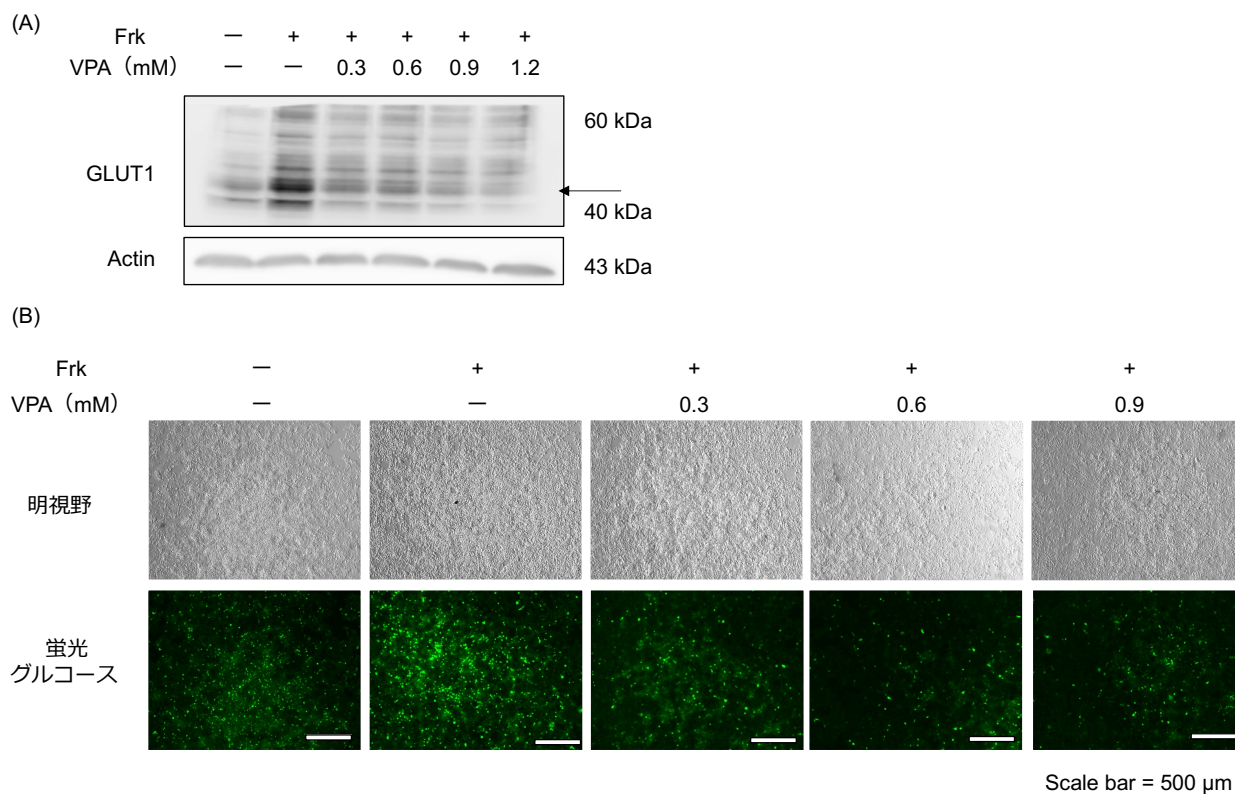


図11 : VPA曝露がBeWoにおけるグルコース取り込みにおよぼす影響評価

未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPA (0.3、0.6、0.9、1.2 mM) を72時間添加した。(A) 細胞を回収しタンパク質を抽出、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、GLUT1の発現量を解析した。また、(B) 細胞を回収しwashした後、蛍光グルコースを添加して、蛍光顕微鏡により細胞内へのグルコース取り込み量を評価した。

「オートファジーが絨毛細胞の酸化ストレスに与える影響評価」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（Preeclampsia: PE）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PE発症に寄与することを明らかにしてきた。また、我々は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すると共に、前年度における成果として、オートファジー抑制が栄養膜細胞（トロフォブラスト）における分化や融合（シンシチウム化）を抑制することを報告した。

近年、銀ナノ粒子や二酸化チタンは絨毛細胞の酸化ストレス（Oxidative stress: OS）や小胞体（ER）ストレス誘導に関わることが報告されているが、PEの発症には合胞体栄養膜細胞（STB）に対するOSや小胞体ストレスが関与するとされる。そこで、本年度は合胞体栄養膜細胞に与えるOSに着目し、PEで低下しているとされる抗酸化酵素HO-1の発現を中心に検討を行った。その結果、絨毛外栄養膜細胞（EVT）類似セルラインとは異なりSTB類似セルライン（BeWo細胞株、primary human trophoblast:PHT）では抗酸化酵素HO-1の定常的発現を認め、OS誘導剤としてのH₂O₂に対し、STB類似細胞ではEVT細胞に比しOSへの耐性が強いことが示された。次にH₂O₂による絨毛細胞へのオートファジー誘導能を評価したところ、H₂O₂濃度依存的にオートファジーの活性化を認めた。H₂O₂とは別のHO-1誘導剤であるHeminでは、オートファジーの活性化は認めなかったことから、HO-1の誘導とオートファジーの活性化は必須ではないことが分かった。一方で、オートファジー欠損細胞と正常細胞でH₂O₂投与によるHO-1誘導能に差を認めず、HO-1の誘導にはオートファジーは必須ではないことが判明した。次に、STBにおける恒常的HO-1発現へのオートファジー調整剤の影響を評価した。オートファジー抑制剤であるBafilomycin A1（BAF）投与により常時発現していたHO-1の低下を認めたが、活性化剤ではHO-1発現に変化は認めなかった。次に複数のオートファジー抑制剤による検討を行ったが、ChloroquineやWortmanninではHO-1の低下は認めなかった。BAFによるHO-1発現低下のメカニズム解明のため、OS耐性機構であるp62-keap1-Nrf2経路を評価したところ、BAF処置によりp62増加を認めたが、keap1やNrf2、リン酸化Nrf2は低下を認めた。またp62によるNrf2活性化に必須であるNBR1はBAF処置で低下しており、BAFによるHO-1低下にはNBR1が関与する可能性が示唆された。

オートファジー抑制が栄養膜細胞の分化抑制、合胞体栄養膜細胞における抗酸化酵素HO-1の低下をもたらすことが分かった。これまでにERストレスがオートファジー抑制に関わることも分かっており、ナノ粒子蓄積がOSやERストレスを助長し、胎盤形成不全、ひいてはPEや胎児発育不全の要因となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、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。また近年、二酸化チタンが絨毛細胞のオートファジー活性化やOS、ERストレスに関与すること（Titanium dioxide nanoparticles induce proteostasis disruption and autophagy in

human trophoblast cells. Zhang Y et al. Chem Biol Interact. 2018. PMID: 30273564）、またナノ銀もOS等の誘導に関与することが知られている（Silver bionanoparticles toxicity in trophoblast is mediated by nitric oxide and glutathione pathways. Bustos PS et al. Toxicology. 2021. PMID: 33662506）。そこで

今回、ナノ粒子による PE 関連ストレス誘導を検討する前段階として、絨毛栄養膜細胞の OS とオートファジーの直接的関与を調べることにした。

B. 研究方法

1. 細胞培養および絨毛培養

合胞体栄養膜細胞セルラインとして絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株と初代ヒト栄養膜細胞である PHT 細胞を使用し、絨毛外栄養膜細胞セルラインとして、HchEpC1b 細胞、HTR8/SVneo 細胞、TCL1 細胞を使用した。

BeWo 細胞は 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、PHT 細胞は、10%FBS、1%Penicillin/streptomycin、epidermal growth factor(10ng/mL)および Y27632(10 μ M)を添加した Iscove's Modified Dulbecco's 培地で培養した。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。すべての細胞は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。

絨毛組織は 37 週以降の正期産における帝王切開分娩婦より同意を得て採取した。採取した組織は直ちに PBS で十分に洗浄し、絨毛のみに分離・細切したのち約 25mg の小片とした。10%FBS および 1%Penicillin/streptomycin を添加した RPMI-1640 培地で培養した。全ての組織は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。

2. タンパク質定量の評価

各細胞群を培地で培養し、定常時の HO-1 発現を評価した。OS として H₂O₂ を 24 時間添加し、LC3-II 発現を評価することでオートファジー活性を評価した。

オートファジー阻害剤として Bafilomycin A1(BAF;20nM)、Chloroquine(CHQ;50 μ M)、Wortmannin (Wor;10 μ M)を、オートファジー活性化剤として Torin(10 μ M)、Tat-beclin1 (20 μ M) を使用した。OS 保護機構を評価するため、各種薬剤を投与し p62、keap1、Nrf2、リン酸化 Nrf2、NBR1 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. 細胞増殖抑制評価

OS による細胞障害評価のため、WST-1 を用いて細胞増殖抑制を評価した。BeWo 細胞を 96well 細胞培養プレートに 1.2 \times 10⁶ 個播種し一晩培養

した後、濃度を調整した H₂O₂ 添加培地 100 μ L で培地を置き換えて 24 時間培養を行った。処置後に WST-1 溶液 100 μ L に入れ替え、マイクロプレートリーダーを使用して波長 450/655nm で吸光度を測定した。

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 細胞は患者同意を得たサンプルから作成され、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ており、倫理面に配慮している。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 合胞体栄養膜類似細胞は HO-1 を恒常的に発現し、酸化ストレス H₂O₂ に耐性をもつ

絨毛細胞の種類によって HO-1 発現に違いがあるかを評価するため、各種細胞の定常時の HO-1 発現を評価した。その結果絨毛外栄養膜細胞 (EVT) に類似する細胞群とは異なり、合胞体栄養膜細胞に類似する BeWo 細胞や PHT 細胞では定常時に高レベルの HO-1 発現を認めた (図 1A)。実際に H₂O₂ による細胞増殖抑制評価では、BeWo 細胞は 250 μ M の濃度までは細胞増殖に影響を与えず、500 μ M 以上で増殖が抑制された (図 1B)。一方で HTR8、HchEpC1b、TCL1 細胞は EVT 由来であるが、H₂O₂ に非常に感受性が高く、12.5 μ M の H₂O₂ 処置で細胞増殖抑制を認めた (図 1C,D,E)。これらの結果は、合胞体栄養膜細胞は EVT に比し、定常時より HO-1 を高発現し、その結果 OS に耐性を持っていることが示唆された。

2. H₂O₂ は絨毛細胞株においてオートファジー活性化に関わる

次に HO-1 を誘導するとされる H₂O₂ がオートファジーを活性化させるかを評価した。BeWo 細胞において H₂O₂ の濃度依存的に LC3-II の増加が認められ、さらに Baf 処理によって無処理に比し LC3-II の更なる増加を認めた (=オートファジーフラックスの上昇)。つまり、H₂O₂ はオートファジー活性化を示した (図 2A)。また、それ

に伴い HO-1 発現も増加した (図 2A,B)。同様の結果は Hch 細胞でも認められた (図 2C)。次に HO-1 誘導とオートファジー活性化の関与を評価したが、HO-1 誘導剤である Hemin 投与では、HO-1 が増加するにもかかわらずオートファジーフラックスの増加は認めなかった (図 2D)。以上より酸化ストレス H₂O₂ は HO-1 誘導とオートファジー活性化をもたらすが、HO-1 誘導は必ずしもオートファジー活性化を必要としないことが示唆された。

3. オートファジー抑制剤 Bafilomycin A1 は合胞体栄養膜細胞の HO-1 を低下させる

Hemin による HO-1 誘導はオートファジーを活性化させなかったため、オートファジー阻害剤または活性剤が HO-1 発現に影響を与えるかを評価した。BeWo 細胞にオートファジー抑制剤である Bafilomycin A1 (BAF) を投与すると、HO-1 の発現が低下した (図 3A,B)。一方でオートファジー活性剤である Torin や Tat-beclin1 では HO-1 発現に影響はなかった (図 3A)。さらに別のオートファジー抑制剤による検討を行ったが、Chloroquine (CHQ) や Wortmannin (Wor) では HO-1 の低下を認めなかった (図 3C,D)。以上のことからオートファジー抑制剤である BAF に HO-1 発現低下作用があることが分かった。

4. HO-1 誘導は通常のオートファジー経路ではなく p62-NBR1 軸が重要である

BAF によるオートファジー阻害が HO-1 発現を低下させたことから、絨毛細胞における HO-1 誘導にはオートファジー活性化が必要と予想した。そこで、オートファジー欠損細胞株である HchEpC1b-Atg4BC74A 細胞に H₂O₂ 処置を行ったが、Wild type と同等の HO-1 誘導能を認めた (図 4A)。以上のことから非選択的に作用する通常のオートファジー経路は H₂O₂ による HO-1 誘導に必須ではないことが明らかとなった。

次にオートファジーに関連した OS 誘導機構である p62-keap1-Nrf2 軸に着目し、BAF による HO-1 低下のメカニズムを検討した。一般的に OS により Nrf2 は keap1 より遊離・活性化し、核内に移行することで HO-1 や NQO1 などの抗酸化酵素を発現させる。同経路において、p62 は keap1-Nrf2 の遊離を促進し、Nrf2 活性化を誘導する。BeWo 細胞において H₂O₂ あるいは BAF を投与したところ、BAF は HO-1 並びに NQO1

を低下させた (図 4B,C)。また、Nrf2 や活性型であるリン酸化 Nrf2 は BAF 投与で減少した (図 4B)。一方で p62 は H₂O₂ と BAF 両薬剤で増加していたが、リン酸化 p62 (Ser403 と Ser349) は BAF で著明な増加を認めた (図 4B)。さらに p62 を介する Nrf2 活性化に関与する NBR1 は BAF 投与で有意に低下した (図 4B,D)。

5. Chloroquine は p62-NBR1-Nrf2 軸を介して HO-1 発現を維持する

更に HO-1 発現へのメカニズムを明らかとするため、オートファジー抑制剤である BAF と CHQ の p62-NBR1-Nrf2 軸への影響を比較した (図 5A)。CHQ 投与は HO-1 および NQO1 の発現を維持し、p62 は増加するもののリン酸化 p62 (ser403, Ser349) は増加を認めなかった (図 5B,C,D,E)。さらに BAF で低下する NBR1 は CHQ では低下を認めなかった (図 5F)。Nrf2、リン酸化 Nrf2、keap1 についても CHQ 投与では低下しなかった (図 5G,H,I)。以上より、BAF による HO-1 発現の低下には NBR1 発現の低下が関与することが示唆された。

6. Bafilomycin A1 と Chloroquine による絨毛への影響

最後に、ヒト胎盤における影響を評価するため、正期産の正常胎盤を採取し、H₂O₂ および BAF、CHQ を投与した。実際の胎盤においても H₂O₂ 投与により HO-1 の誘導が確認された (図 6A)。BAF 投与では 10nM、20nM とともに HO-1 の低下を認めた。CHQ 投与では 50μM で NQO1 発現は保たれていたが、HO-1 は軽度低下していた。NBR1 に関しては BAF と CHQ で差がなかった (図 6B)。組織培養では、絨毛細胞と全く同様という結果は得られなかったが、これは間質細胞など絨毛細胞以外の細胞が多く含まれるためと考えられた。しかし、BAF には抗酸化酵素を低下させる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、絨毛細胞の種類により定常時の HO-1 の発現に差があることが明らかになった。つまり母児間の栄養・ガス交換やホルモン分泌に関わる合胞体栄養膜細胞が OS により抵抗性を持つことが明らかとなった。さらに通常のオートファジー経路ではなく、オートファジー抑制剤である BAF による HO-1 低下は、選択的オートファ

ジ-経路にある NBR1 が関与していることが示された。

妊娠初期に起こるとされるらせん動脈のリモデリング不全により(我々はこの異常にもオートファジー低下が関与することを報告している)、合胞体栄養膜細胞に様々なストレスが惹起されることが、PE 発症につながるとされる。また PE 胎盤では HO-1 が低下するという報告があり、本研究結果と合わせると、定常時に発現している合胞体栄養膜細胞の HO-1 低下が PE 発症につながると予想できる。さらにその HO-1 低下に関して、選択的オートファジーの関与と p62-NBR1-Nrf2 軸が重要なことも示唆された。一方で臨床的にも全身性エリテマトーデス妊婦にも使用される CHQ は BAF と異なり、HO-1 を低下させないことで安全に使用可能である可能性も示唆された。

以上より、今後ナノ粒子の妊娠中の安全性評価のために2つの方法を提案する。一つは、ナノ素材およびその修飾による絨毛細胞への OS 並びに ER ストレス誘導能評価法を確立することである。もう一つは、オートファジー活性に影響を受けず絨毛細胞内への蓄積を回避できるナノ素材を探索することである。これらを明らかにすることで、妊娠中の暴露を避けるべきナノ素材が明らかになると考える。一方で、胎盤低形成、胎児発育不全、妊娠高血圧腎症に関与するナノ素材の同定も疫学的調査により行っていくことが重要と考えている。

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.*, 3(2): 112-26, 2022.
2. Furuta A., Shima T., Yoshida-Kawaguchi M., Yamada K., Yasuda I., Tsuda S., Yamaki-Ushijima A., Yoneda S., Higashisaka K., Cheng SB., Matsumoto K., **Tsutsumi Y.**, Sharma S., Saito S., **Nakashima A.**: Chloroquine is a safe autophagy inhibitor for sustaining the

expression of antioxidant enzymes in trophoblasts., *J. Reprod. Immunol.*, 155: 103766, 2023.

3. Cheng S, Huang Z, Jash S, Wu K, Saito S, **Nakashima A**, Sharma S. Hypoxia-Reoxygenation Impairs Autophagy-Lysosomal Machinery in Primary Human Trophoblasts Mimicking Placental Pathology of Early-Onset Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(10):5644.

2. 学会発表

1. Furuta A., Kawaguchi M., Yamaki A., Yasuda I., Tsuda S., Tomoko S., Yoneda S., Nakashima A. : Autophagy suppression inhibits the syncytialization of trophoblast cells., ASRI 2022 Annual Meeting, 22-25 May, 2022.
2. 古田 惇, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジーと妊娠高血圧腎症発症と治療開発., 第7回中日本産婦人科セミナー, 2021年10月1日-2日.
3. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: SLE 妊婦に使用される Chloroquine (オートファジー抑制剤) による絨毛毒性への検討., 第42回日本妊娠高血圧学会学術集会, 2022年10月29日-30日
4. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジー抑制剤 Chloroquine の酸化ストレスに対する新規作用の解明., 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2022年11月18日-19日
5. 古田 惇, 山田清貴, 吉田美保子, 山木明美, 島 友子, 米田 哲, 中島彰俊: オートファジー因子 NBR1 は絨毛における酸化ストレス耐性に重要な役割を果たす., 第30回日本胎盤学会学術集会, 2022年11月25日-26日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

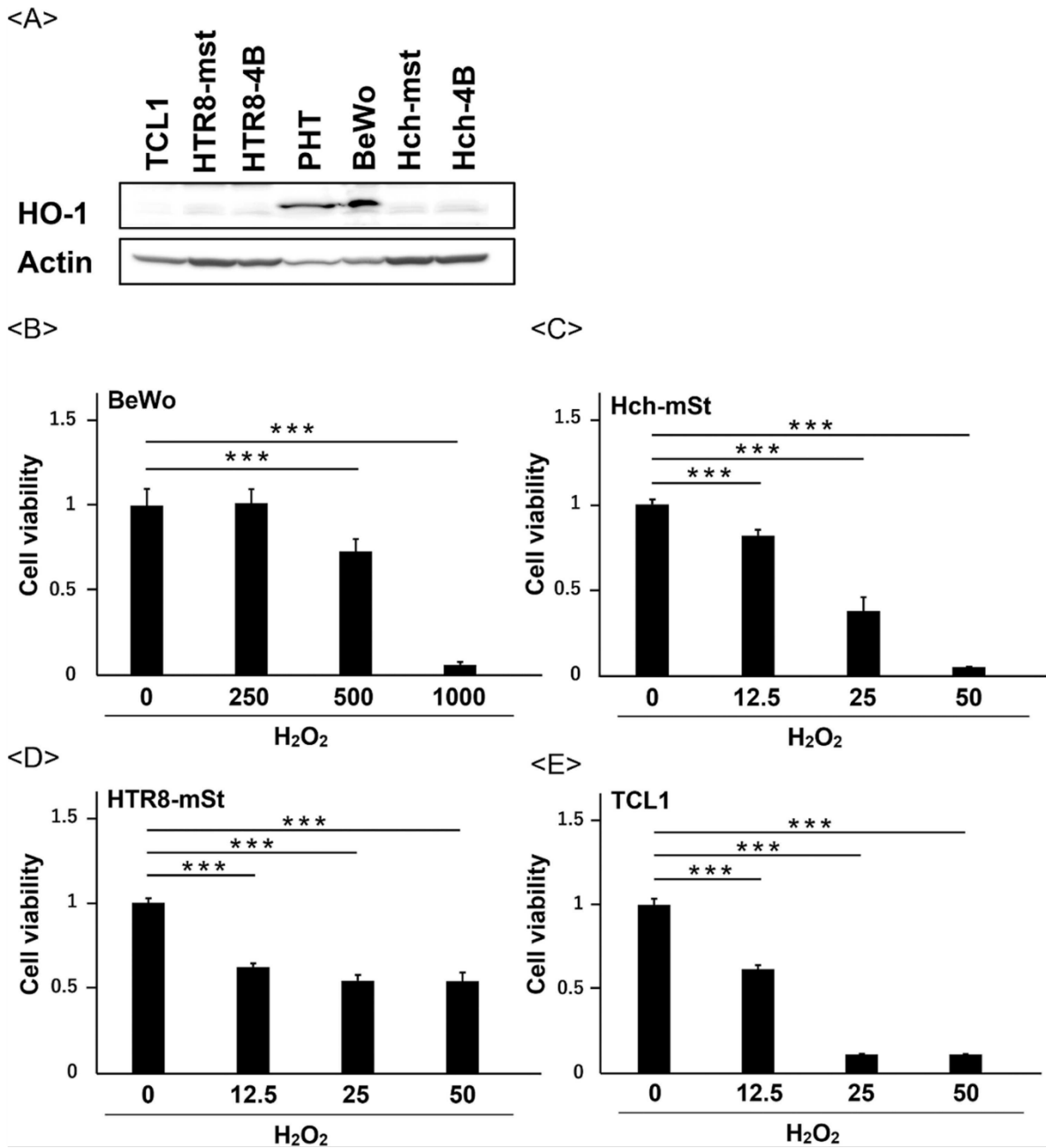


図1：トロフォブラストにおけるHO-1発現と酸化ストレス抵抗性

(A) 様々な種類の絨毛膜細胞におけるHO-1の発現を定常状態で調べた。タンパク質レベルは、ウェスタンブロッティングを用いて検出した。(B) BeWo細胞、(C) HchEpC1b-mSt細胞、(D) HTR8-mSt細胞、および(E) TCL1細胞を様々な濃度のH₂O₂ (μM) で24時間処理した細胞生存率をWST-1アッセイを用いて評価した。グラフは処理細胞の細胞生存率を示している。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは、平均値±S.D.で表した。

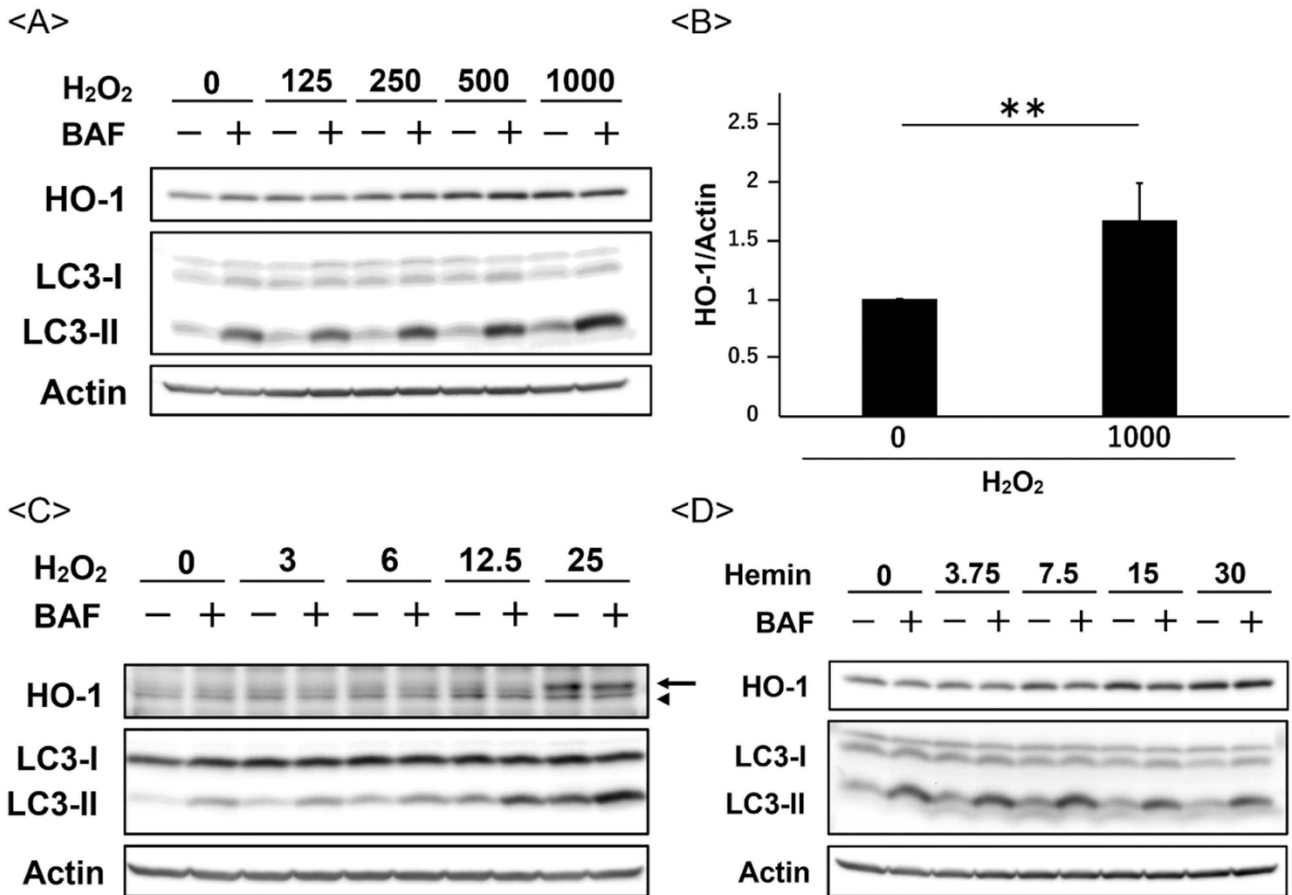


図2：絨毛細胞株におけるH₂O₂によるHO-1発現とオートファジーフラックス

(A) BeWo細胞を様々な濃度のH₂O₂ (125~1000 μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。(B) 1000μMのH₂O₂で処理したBeWo細胞におけるHO-1の発現量をアクチンで正規化したグラフ。(C) HchEpC1b-mSt細胞を、様々な濃度のH₂O₂ (3~25μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。(D) BeWo細胞を、HO-1の誘導物質である様々な濃度のヘミン (125 - 1000 μM) で24時間処理し、蛋白回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)処置した。ウェスタンブロットでHO-1 (矢印は特異的バンド、矢頭は非特異的バンドを示す)、LC3-I/II、Actinを定量化した。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは平均値±S.D.で表した ** p < 0.01.

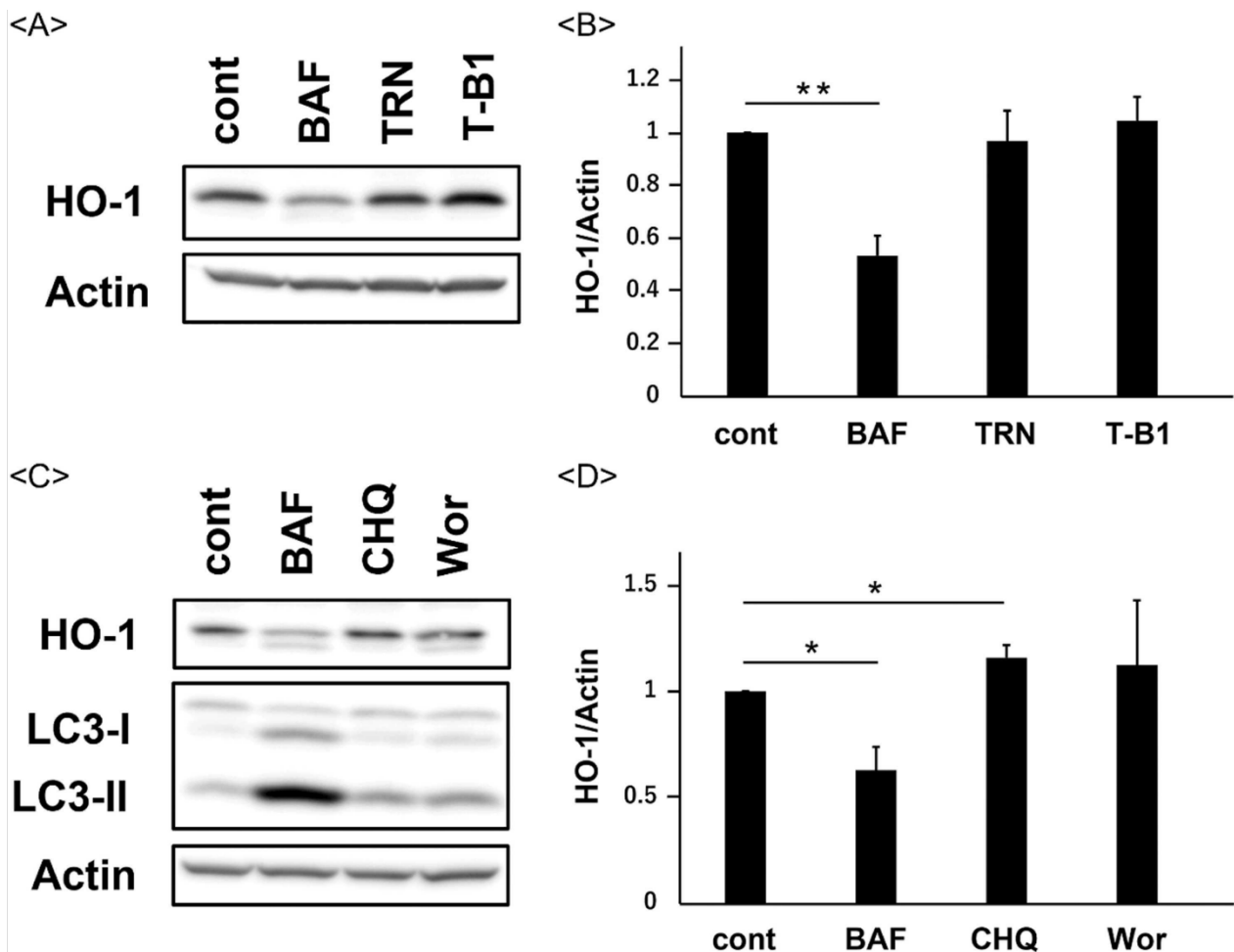


図3 : オートファジー阻害薬バフィロマイシンA1によるHO-1発現の低下

(A) オートファジー阻害剤であるバフィロマイシンA1 (BAF, 20 nM)、オートファジー活性化剤であるTorin-1 (TRN, 10 nM) およびTat-Beclin1 (T-B1, 20 μM) で48時間処理し、BeWo細胞のHO-1の発現量をウェスタンブロッティングにより評価した。(B) BeWo細胞中の各薬剤処理におけるアクチンに対して正規化したHO-1の発現量を示すグラフ。(C) リソソーム機能に影響を与えるオートファジー阻害剤、BAF (20 nM) およびChloroquine (CHQ, 50 μM)、ならびにオートファゴソーム形成を阻害するWortmannin (Wor, 10 μM) で48時間処理したBeWo細胞におけるHO-1の発現を評価した。(D) BeWo細胞の各薬剤処理におけるアクチンの発現量に対して正規化したHO-1の発現量を示すグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは、平均値±S.D.で表される。

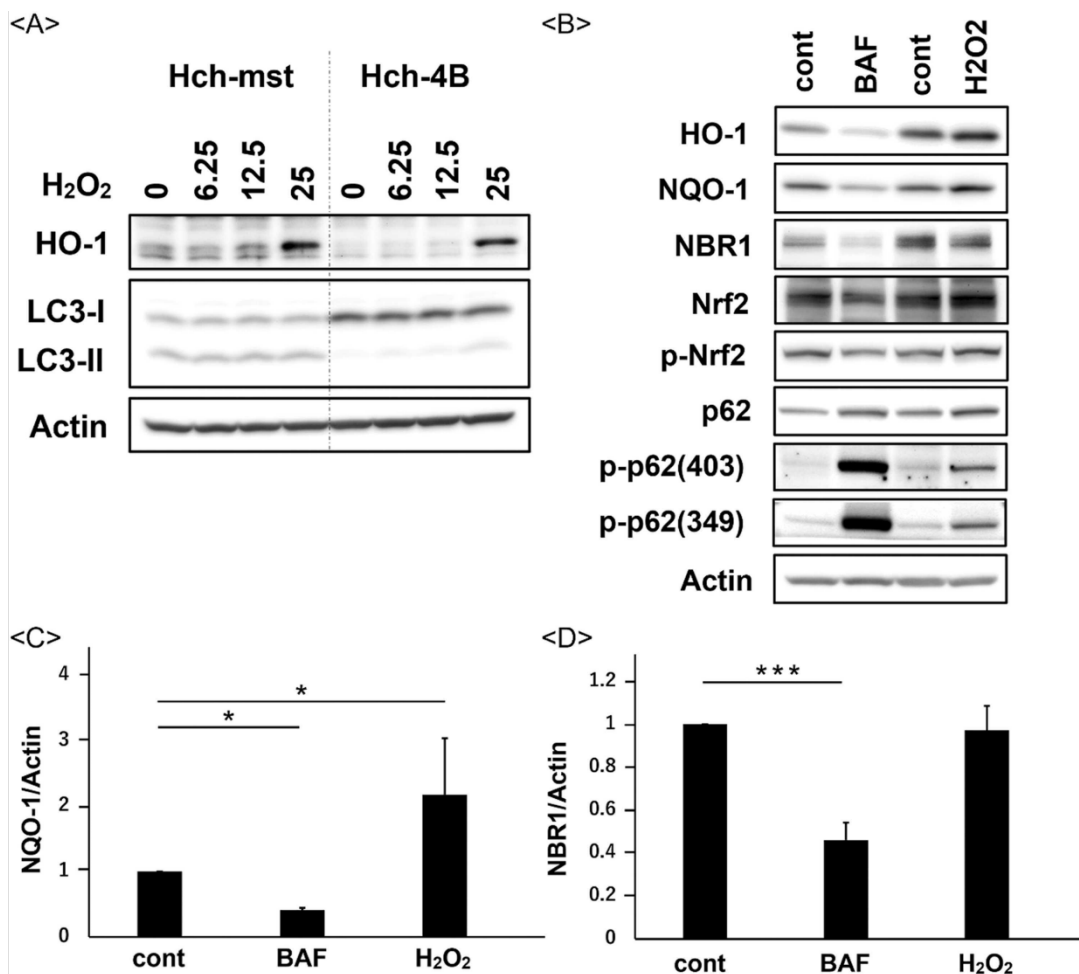


図4：パフィロマイシンA1によるHO-1の発現抑制は、NBR1の低下を伴う

(A) オートファジー正常細胞株であるHchEpC1b-mSt細胞とオートファジー欠損細胞株であるHchEpC1b-Atg4BC74A細胞を様々な濃度のH₂O₂ (6.25 - 25 μM) で24時間処理し、ウェスタンブロットでHO-1、LC3-I/II、Actinを定量化した。(B) BeWo細胞をBAF (20 nM) で48時間処理 (BAFの左側にDMSOコントロールを示す)、またはH₂O₂ (1000 μM) で24時間処理 (H₂O₂の左側に脱イオン蒸留水コントロールを示す) した。ウェスタンブロットでHO-1、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、p62、Ser403およびSer349でリン酸化されたp62、およびアクチンの発現量を定量化した。BeWo細胞における、(C) NQO-1、(D) NBR1の発現量をアクチンの発現量に対して正規化したグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も実施した。データは平均値±S.D.で表した。

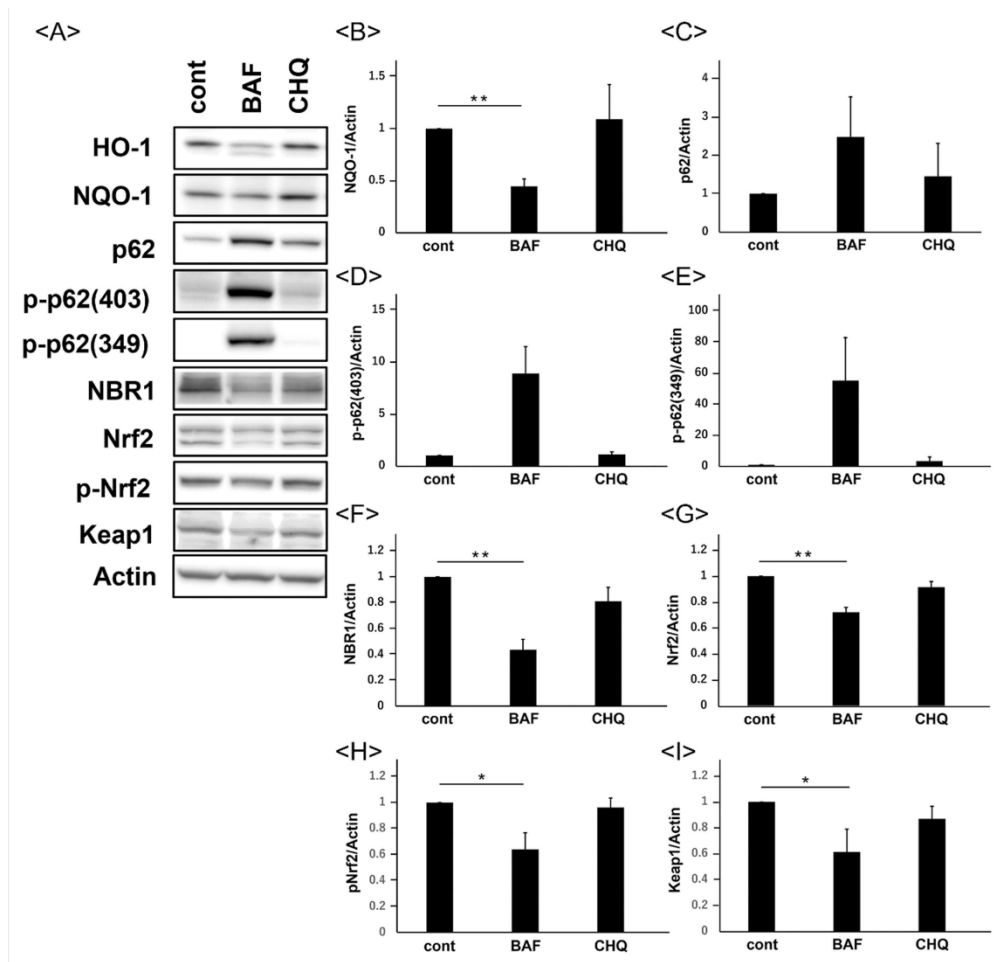


図5：オートファジー阻害剤バフィロマイシンA1またはクロロキニンによるp62-NBR1-Nrf2軸の制御の違い

(A) BeWo細胞をBAF (20 nM)およびCHQ (50 μM)で48時間処理し、ウェスタンブロットでHO-1、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、Keap1、p62、Ser403およびSer349でリン酸化されたp62、およびアクチンを定量化した。各薬剤処置におけるBeWo細胞の、(B) NQO-1、(C)p62、(D) p-p62(Ser403)、(E) p-p62(Ser349)、(F) NBR1、(G) Nrf2、(H) p-Nrf2、(I) Keap1の発現量をアクチンに対して標準化したグラフ。結果は、少なくとも3つの独立した実験から得られた。有意差検定も行った。データは平均値±S.D.で示した * p < 0.05, ** p < 0.01.

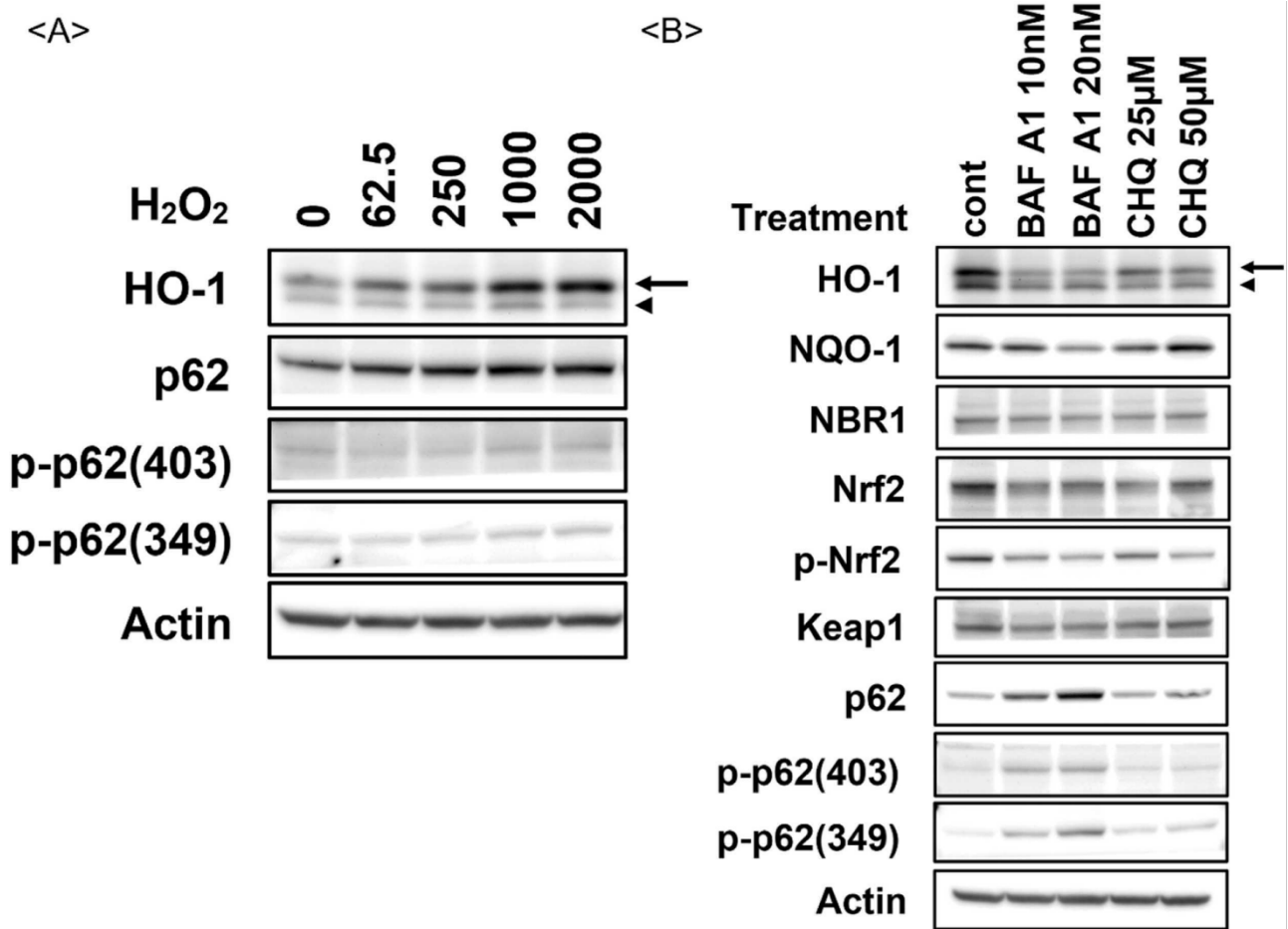


図6：ヒト絨毛組織におけるバフィロマイシンA1またはクロロキンによる抗酸化蛋白および選択的オートファジー関連蛋白の発現
 胎盤絨毛組織は帝王切開を受けた合併症のない妊娠の女性から得た。(A) 絨毛組織を様々な濃度のH₂O₂ (62.5 - 2000 μM)で48時間処理した。ウエスタンブロットでHO-1、p62、p-p62(Ser403)、p-p62(Ser349) およびアクチンを定量化した。(B) 絨毛組織を BAF (10 と 20 nM) または CHQ (25 と 50 μM) で72 時間処理し、ウエスタンブロットでHO-1 (矢印は特異的バンド、矢頭は非特異的バンド)、NQO-1、NBR1、Nrf2、p-Nrf2、Keap1、p62、p-p62(Ser403)、p-p62(Ser349)、およびアクチンを定量化した。

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

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
Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Silver nanoparticles suppress retinoic acid-induced neuronal differentiation in human-derived neuroblastoma SH-SY5Y Cells.	ACS Appl. Nano Mater.	5	19025-34	2022
Sakahashi Y., Yamamoto R., Kitahara G., Izutani R., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Amorphous silica nanoparticles decrease human chorionic gonadotropin β expression during syncytialization of BeWo cell.	BPB Reports	5	154-8	2022
Sakahashi Y., Higashisaka K., Isaka R., Izutani R., Seo J., Furuta A., Yamaki-Ushijima A., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y.	Silver nanoparticles suppressed forskolin-induced syncytialization in BeWo cells.	Nanotoxicology	16	883-94	2022
Higashisaka K.	Health Effects and Safety Assurance of Nanoparticles in Vulnerable Generations.	Biol Pharm Bull	45	806-12	2022

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.	3(2)	112-26	2022
Furuta A., Shima T., Yoshida-Kawaguchi M., Yamada K., Yasuda I., Tsuda S., Yamaki-Ushijima A., Yoneda S., Higashisaka K., Cheng SB., Matsumoto K., Tsutsumi Y., Sharma S., Saito S., Nakashima A.	Chloroquine is a safe autophagy inhibitor for sustaining the expression of antioxidant enzymes in trophoblasts.	J. Reprod. Immunol.	155	103766	2023
Cheng S, Huang Z, Jash S, Wu K, Saito S, Nakashima A, Sharma S.	Hypoxia-Reoxygenation Impairs Autophagy-Lysosomal Machinery in Primary Human Trophoblasts Mimicking Placental Pathology of Early-Onset Preeclampsia.	Int. J. Mol. Sci.	23(10)	5644	2022
東阪和馬, 山下琢矢	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～.	Yakugaku Zasshi	143	119-20	2023
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.	Yakugaku Zasshi	143	133-8	2023

「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5年5月9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)4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。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 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

3. 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)

4. 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5年5月8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)4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 彰俊 (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 <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。