

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不溶性の二酸化チタンの調整・毒性評価プロトコールを作成した。②に関して、活性酸素種 (ROS) 依存性 microRNA とその標的タンパクの発現解析より、複数の経路から細胞傷害に關与することが推測された。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい *in vitro* 評価系として考えられる切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびその細胞傷害機構の解明を報告してきた。本研究での分担は、(1)切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築、(2) 磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明およびエピジェネティ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用のプロトコール作成を行った。(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。ナノ粒子傷害機構に関して、先行実験として、前立腺癌細胞株 DU145 を用いた。

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、超音波破砕機 (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毒性評価プロトコール作成の確認および確定：

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

した。

①4000 µg/mL の TiO₂ を作製のため 15 mL チューブに 20 mg の TiO₂ を量り 5 mL のメディアウムに溶かした。

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。

③TiO₂ 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。

④96 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 TiO₂ 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 TiO₂+メディアウム+CCK8 : Blank

② メディアウム+Cells+CCK8 : Control

③ TiO₂+メディアウム+Cells+CCK8 : Sample

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

4) 二酸化チタンナノ粒子の取込み解析

10cm シャーレに A549 細胞を 5x10⁵ 細胞数を播種し、2 日後に TiO₂ 250 µg/mL 添加し、1 日後回収し、透過電子顕微鏡 (TEM) 用に回収し、処理後観察した。

ナノマテリアルの傷害機構の解析

5) 候補 microRNA 発現解析: miR-5787 および miR-494-3p

候補 microRNA に関して、miR-5787 および miR-494-3p を選択した。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 1.0x10⁵ cells/well、48 時間の場合は 8.0x10⁴ cells/well、72 時間の場合は 6.0x10⁴ 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 µg/mL)、100 µg/mL、200 µg/mL、

400 µg/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、15000xg、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 BIRD™ 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 はインターカラー法で、miRNA は TaqMan プロブ法で、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 分加温しそれを 55 サイクル繰り返した。定量化は、ΔΔCt 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。

6) eIF5 の発現解析：

候補 microRNA である miR-5787 の標的である eIF5 および miRNA-494-3p の標的であるを選択した。

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 パジェラン (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 パワープロット・ミニ (ATTO, NewYork, USA) を用いて 60 分で転写した。転写終了後、AE-1477 EzBlock CAS (ATTO, NewYork, USA) (リン酸化の場合は AE-1475 EzBlock Chemi (ATTO, NewYork, USA)) にメンブレンを浸し、60 分間振とうした。ブロッキング終了後、メンブレンを洗浄し、各希釈率で希釈した一次抗体に、4°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って行った。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プロトコール確定：凝集しやすい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、新たなプロトコールを作成し、確定した。

図 1 に、二酸化チタンナノ粒子の調整法について示す。また、図 2 に、プロトコールを示す。

TiO₂の調整
 1000-15.63ug/ml の TiO₂ の希釈系列作製
 ①4000ug/ml の TiO₂ を作製のため 15ml チューブに 20mg の TiO₂ を量り 5ml のメEDIUMに溶かす
 ②水中にてソニケーター設定 PWM30%で 15ml チューブの中で 1分プローブを上下に動かし分散
 ③TiO₂ が分散浮遊しているうちに短時間で希釈系列を作製する

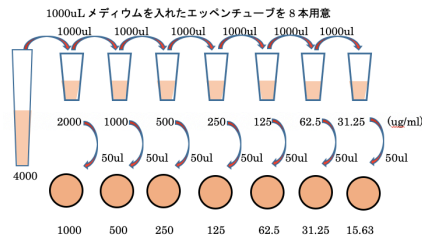


図 1. 二酸化チタンナノ粒子調整

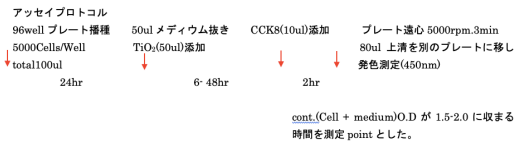


図 2. 二酸化チタンナノ粒子細胞毒性評価プロトコール

表 1 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再度記す。

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		TKP102*		
62.5 µg/ml				AMT600**
31.25 µg/ml				AMT600**, TKP102*
15.6 µg/ml	AMT600*, TLP102*	AMT600*		AMT600**, TKP102**
B				
	6h	12h	24h	48h
500 µg/ml				MT150*
125 µg/ml			TKP102**	

Statistics by dunnett's test

細胞増殖を抑制した MT150 と促進させた MT500、AMT600 の細胞内取込み像を示す (図 3)。定性的であるが、明らかに MT150 の細胞内取込みが多いと観察できる。しかしながら、AMT600 は多く取込みながら、増殖は抑制しなかった。

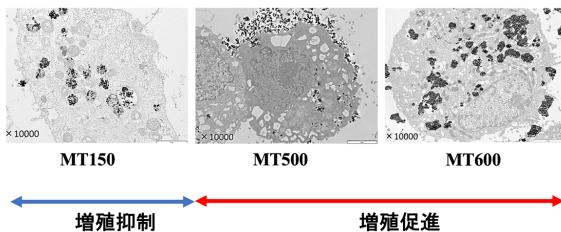


図 3. 二酸化チタンナノ粒子細胞内取込み像

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 の発現を Real-Time PCR で解析を行った (図 4,5 前年度データ)。

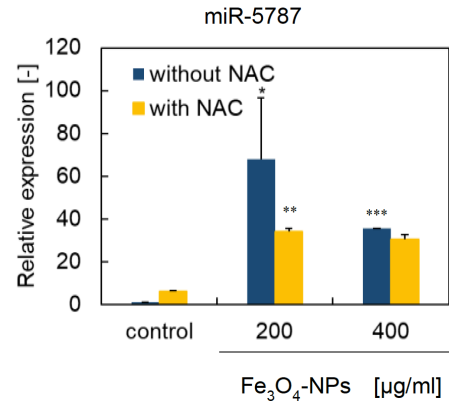


図 4. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-5787 発現量変化

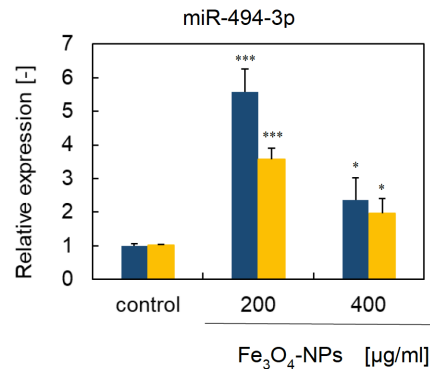


図 5. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-494-3p 発現量変化

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。この 2 つの標的因子を表 2 に示す。前年度より、eIF5 については既に報告しているが、今年度はさらに CXCR4 についての発現も解析を行なった。

表 2. 磁性体ナノ粒子曝露後に発現亢進した miRNAs

miRNA	DU145	LNCaP	Target	Functions
miR-5787	4.14	3.18	eIF5	Cell Proliferation ¹⁾
miR-6785-5p	3.45	1.03	CDK4/6	Cell proliferation ²⁾
miR-6769b-5p	3.39	2.09		
miR-188-5p	3.31	1.35	ZFP91	Cell proliferation ³⁾
miR-513c-5p	2.91	2.09		
miR-494-3p	2.87	2.3	CXCR4	Cell Proliferation ⁴⁾
miR-7641	2.46	2.13	CXCL1	Neovascularization ⁵⁾
miR-7150	2.43	3.14		
miR-4459	2.32	1.79	CDC20B	Cell Cycle ⁶⁾
miR-4721	2.29	1.43		
miR-1973	2.19	1.76		
miR-6812-5p	2.16	1.51		
miR-513a-5p	2.06	1.49	Bcl-2	Apoptosis ⁷⁾
miR-4485-3p	2.04	1.56		
miR-6124	2.03	1.03		
miR-7847-3p	1.76	2.07		
miR-6090	1.33	2.02		

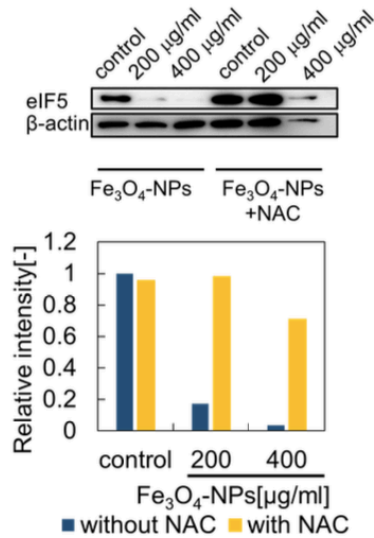


図 6. 磁性体ナノ粒子曝露時の eIF5 タンパク質発現

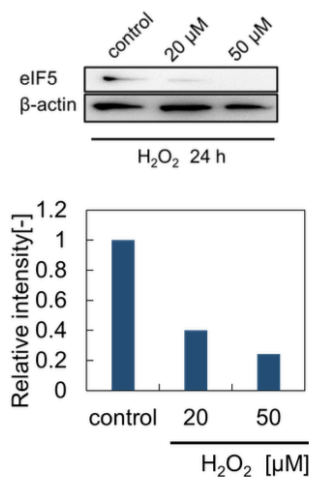


図 7. 過酸化水素曝露時の eIF5 タンパク質発現
磁性体ナノ粒子曝露により、特に 400 µg/mL において、eIF5 のタンパク発現量はほとんど消失するまで減少し、NAC 処理によりコントロールに近いレベルまで回復するのを認めた (図 6)。特に ROS の影響を受けた抑制を認めた。これは、過酸化水素曝露においても同様の結果を得た (図 7)。

CXCR4 タンパク質の発現も eIF5 と同様に、磁性体ナノ粒子濃度依存的に減少傾向を認めた (図 8)。

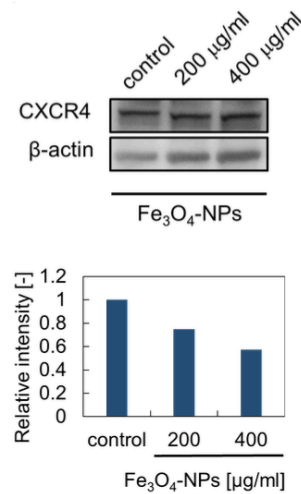


図 8. 磁性体ナノ粒子曝露時の CXCR4 タンパク質発現

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 系における評価では注意しなければならない。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プロトコールを作成した。グループの他への報告として、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ず、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。

磁性体ナノ粒子の曝露により、2 種類の microRNA(miR5787、494-3p)の発現上昇、その標的遺伝子である eIF5 および CXCR4 の発現減少が認められた。また、これらの microRNA は ROS 依存性であることが示された。これらの結果をまとめ (図 9) に記す。microRNA の発現プロファイルから、ROS 依存性であり、複数の経路から細胞傷害に関与することが推測された。

microRNA の研究は、横浜国立大学大学院

工学研究院医工学研究室（旧渡邊研究室、現飯島研究室）との共同研究である。

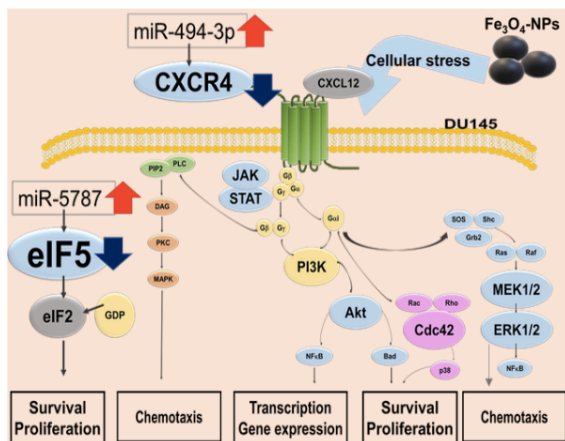


図9. まとめ

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10）。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]。講座内での他の研究者の報告では、進行癌（前立腺癌、膀胱癌）において、一次線毛は消失していると報告している（私信）。また、1次線毛が、脂肪組織形成に関わることを報告した（*Cell Rep*, in press）。

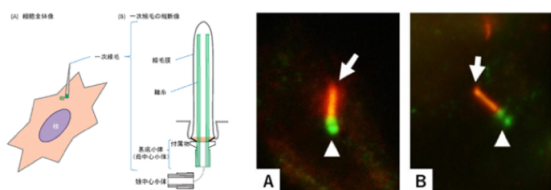


図9. 一次線毛について

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamakawa D, Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, Maeo Y, Watanabe M, Inagaki M. Primary cilia dependent-lipid rafts/caveolin dynamics regulate adipogenesis. *Cell Rep*, 34(10), 108817, 2021.
2. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductor for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*, 112(1), 7-15, 2021.
3. Kajiwara S, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Nishikawa K, Kanda H, Arima K, Watanabe M, Sugimura Y. Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure. *Lab Invest*, 100(5), 670-681, 2020.
4. Yamamoto N, Eguchi A, Hirokawa Y, Ogura S, Sugimoto K, Iwase M, Watanabe M, Takei Y. Expression pattern of PLXDC2 in human hepatocellular carcinoma. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 39(2), 57-60, 2020
5. Mahmud MRA, Ishii K, Bernal-Lozano C, Delgado-Sainz I, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M, Watanabe M, Takeda S, Cortes-Ledesma F, Sasanuma H. TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands. *Genes to Cells*, 00, 1-16, 2020.
6. Sonoda Y, Sasaki Y, Gunji A, Shirai H, Araki T, Imamichi S, Onodera T, Rydén AM, Watanabe M, Itami J, Honda T, Ashizawa K, Nakao K, Masutani M. Reduced tumorigenicity of mouse ES cells and the augmented anti-tumor therapeutic effects under Parg deficiency. *Cancers*, 12(4), 1056, 2020.
7. Mizutani K, Shirakami E, Ichishi M, Matsushima Y, Umaoka A, Okada K, Yamaguchi Y, Watanabe M, Morita

- E, Yamanaka K. Long-lasting severe dermatitis affect visceral adipose tissue via skin-derived inflammatory cytokines. *Int J Med Sci*, 21, 3367, 2020.
8. Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa Y, Watanabe M. Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer. *Pathol Int*, 70(11), 865-870, 2020.
9. Hirokawa YS, Kanayama K, Kagaya M, Shimojo N, Uchida K, Imai H, Ishii K, Watanabe M. SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity. *Exp Mol Pathol.* , 117, 104642, 2020
10. Wakai E, Suzumura Y, Ikemura K, Mizuno T, Watanabe M, Takeuchi K, Nishimura Y. An integrated in silico and in vivo approach identifies protective effects of palonosetron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Pharmaceuticals*, 13,480, 2020.

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. 学会発表

1. Oshio L, Nakagawa Y, Watanabe M, Iijima K. Functional analysis of microRNA in anti-prostate cancer activity of magnetic iron oxide nanoparticles. 第 43 回日本分子生物学会年会.オンライン 12.2-4, 2020.
2. Inagaki M, Kasahara K, Yamakawa D, Matsuda C, Watanabe M. The role of primary cilia in cell growth, differentiation and tumorigenesis. 第 79 回日本癌学会学術総会.リーガロイヤルホテル広島.10.1-3, 2020.
3. Watanabe M. The application of nanomaterial in anti-tumor druds. China-ASEAN International Cancer Precision Medicine Conference. Guangxi Medical University. 11.6-8, 2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況