

## 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

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命綱的に不可欠であり、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ってしま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、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極めて限定的であるうえ、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、胎児と母体を両輪で解析することは言うまでも無く、そのうえでさらに、「母体と胎児をつなぐ胎盤」に関する影響解析も集中的になされるべきであり、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必須と言える。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し、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の構築を試みた。

令和 3~5 年度における研究成果において、①胎児に対する毒性兆候が報告されているバルブ口酸が、ヒト絨毛がん細胞株 (BeWo) における、*HIF-1 Pathway* を介した胎盤ホルモン *hCG* の産生増加やグルコースの取り込み低下を引き起こすことを初めて明らかにするなど (J. Toxicol. Sci., in press)、バルブ口酸が、胎児直接的だけでなく、胎盤を介して間接的にも毒性を引き起こすことを国内外で先駆けて明らかにすると共に、「新たな生殖発生毒性の評価手法」の開発に資する切り口を得た。そこで、これら「新たな生殖発生毒性の評価手法」の検証を兼ね、銀ナノ粒子をモデルナノマテリアル (NM) として供し、その胎盤毒性を探索 (スクリーニング) したところ、マウス胎盤形成期に静脈内投与することで、②胎盤に移行し得ることや、③胎盤の低形成を誘導し得ることを示した。また、④BeWo における forskolin 誘導性の合胞体化の進行を抑制すること (Nanotoxicology 2022)、⑤合胞体化の進行過程においてエンドサイトーシス経路から細胞内に取り込まれることを見出した。さらに、⑥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 (BPB Reports 2022)。これら知見は、未だ十分に理解されていない NM の生殖発生毒性の理解に向けて、胎盤毒性の観点からのリスク解析の必要性を初めて示すと共に、バルブ口酸による胎盤毒性研究を通じて得られた新たな生殖発生毒性評価手法の有用性、特に NM 等の化学物質に係る胎盤毒性の探索と新規同定に有効であることを示唆するものである。

加えて近年、一部の NM は絨毛細胞の酸化ストレス誘導に関わることが報告されており、また妊娠高血圧腎症の発症には合胞体栄養膜細胞に対する酸化ストレスが関与するとされる。そこで、細胞内恒常性維持機構としてのオートファジー経路において酸化ストレスとの関与について検討したところ、⑦オートファジー抑制が栄養膜細胞における分化や融合を抑制すること (Reprod. Med. 2022)、⑧合胞体栄養膜細胞において抗酸化酵素 HO-1 が高発現し酸化ストレス耐性を示し、オートファジー抑制が p62-NBR1-Nrf2-HO-1 経路を通して合胞体栄養膜細胞の HO-1 発現を低下させること (J. Reprod. Immunol. 2023)、⑨オートファジー抑制による合胞体栄養膜細胞における HO-1 発現低下が、低酸素条件下での sFlt-1/PlGF 比を上昇させることを見出した。現在、NM の種類・サイズ・修飾の違いによる絨毛細胞への酸化ストレス誘導能およびそれに対抗するオートファジー能の評価法を開発すると共に、*ex vivo* の胎盤評価系の確立を目指している。

以上、NMを含む化学物質への曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠を収集し、胎盤毒性機序を考慮

した「新たな生殖発生毒性の評価手法」を構築につながる知見を多く見出し、当初目標を超える成果が得られた。以上、本研究での成果は、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、リスク評価に係る新たな政策形成のための知見の提供のみならず、現在、行政・国研・学協会・産業界との相談を深めつつ、OECDテストガイドライン等への展開を見据えた今後計画を策定中である。

#### 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)胎盤バザード、(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の構築を試みた。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)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、表面をクエン酸修飾した、粒子径が5、10、30、70 nm (nAg5、nAg10、nAg30、nAg70) 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、蛋白質によりコーティングし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。金ナノ粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が10 nm (nAu10) のものを使用した。非晶質シリカは、一次粒子径が10 nm (nSP10) のものを使用した。使用直前に1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、必要な濃度の粒子分散液を調製した。バルブプロ酸はPBSに溶解させ、実験に供した。

#### 2. 細胞培養

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるBeWoは、非働化处理をした10%ウシ胎児血清(FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液を含むHam's F-12を用いて培養した。ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるJEG-3は、非働化处理をした10% FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液を含むDMEMを用いて培養した。

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、TC1 細胞を使用した。絨毛組織は37週以降の正期産における帝王切開分娩妊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25 mgの薄片とした。10% FBS および 1% Penicillin/streptomycin を添加した RPMI-1640 培地で培養した。

#### 3. 細胞免疫染色による合胞体化の評価

BeWo細胞を8 wellチャンバースライドに播種

した後、Ham's F-12で終濃度50  $\mu\text{M}$ に調製した forskolin溶液とnAg10を添加した。48時間培養後に細胞固定、細胞膜の透過処理を実施し、室温で1時間ブロッキングした。その後1次抗体として anti-desmoplakin I / II を添加し、4  $^{\circ}\text{C}$  で overnightさせた。その後、2次抗体としてGoat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugateを添加し、DAPI染色及びサンプルの封入を行った。共焦点顕微鏡により蛍光画像を撮影し、(合胞体栄養膜細胞内の核数/総核数)  $\times$  100の計算式で合胞体化割合の算出を行うとともに、ImageJ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。

#### 4. Real-time RT-PCR による遺伝子の発現評価

NMによる合胞体化への影響は、BeWo細胞を6 well plateに播種した後、Ham's F-12で終濃度50  $\mu\text{M}$ に調製したforskolin溶液と被験物質をそれぞれ添加し、48時間培養した。

シンシチオトロホプラストにおけるホルモン産生とHIFシグナル経路の分子への影響については、Ham's F-12で終濃度50  $\mu\text{M}$ に調製した forskolin溶液をBeWoに24時間添加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、バルプロ酸を各濃度に調製後、BeWoに72時間添加した。

Total RNA の抽出は、FastGene RNA Kit のプロトコールに準じ、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit により cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、各種プライマーとジーンエース SYBR qPCR ミックス a Low ROX により反応溶液を調製し、CFX384 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、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. HDAC の活性変動評価

各濃度に調製した被験物質と各 HDAC 酵素を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートさせることで活性を測定した。HDAC の活性は、Fluorogenic AssayKit のプロトコールに準じて測定した。

#### 6. BeWo における nAg10 の細胞内取り込み経路の解明

4 $^{\circ}\text{C}$ 条件における nAg10 の BeWo 細胞への取り込み評価については、細胞を 100 $\Phi$  dish で播種した後、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件で1時間培養した後、nAg10 (0.156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、さらに4 $^{\circ}\text{C}$ で3時間培養した。BeWo 細胞における nAg10 の細胞内取り込みとエンドサイトーシス経路との関連解析については、細胞を 100 $\Phi$  dish で播種し、マクロピノサイトーシスに対する阻害実験では、5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) を終濃度 100  $\mu\text{M}$  にて3時間添加した後、終濃度 50  $\mu\text{M}$  の forskolin と 0.156  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の nAg10 を3時間処置して細胞を回収した。クラスリン依存性エンドサイトーシス、および、カベオラ依存性エンドサイトーシスに対する阻害実験では、Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) を終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および、Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M  $\beta$ CD) を終濃度 2.5 mM で1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度 50  $\mu\text{M}$  の forskolin と 0.156  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の nAg10 を3時間処置して細胞を回収した。

#### 7. 銀ナノ粒子の単層細胞膜透過性

ポアサイズ 3.0  $\mu\text{m}$ 、膜面積 0.3  $\text{cm}^2$  の Polyethylene terephthalate メンブレンを有する24ウェルのセルカルチャーインサートにJEG-3を播種し、24時間から48時間毎に培地を交換しながら、約20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、24時間から48時間毎に20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( $\text{ohms} \times \text{cm}^2$ )とした。TEER値がプラトーに達した後、DMEMを用いて目的の濃度とした被験物質をapical側に添加し、添加0、1、3、6、24、48時間後にサンプリングした。銀量は誘導結合プラズマ質量分析(Agilent 7700 Series ICP-MS)を用いて定量した。

#### 8. 妊娠マウスへの nAg10 単回投与後の胎盤、胎児移行性とハザード同定

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  $\text{mg}/\text{kg}$ )を尾静脈内より単回投与し、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。回収した血液、胎仔、胎盤における銀量を ICP-MS により測定した。本研究における動物実験は、大阪大学動物実験規程に準じた。

## 9. ICP-MS による銀濃度測定

回収した細胞を超純水で懸濁した後に超純水と同量の混酸で処理し、37℃で 1 時間振盪した後に ICP-MS に供した。また、PBS でホモジネートした胎仔、胎盤を超純水で希釈した混酸で処理し、37℃で 1 時間振盪した。得られた試料、ならびに、血液を超純水で 100 倍希釈し、ICP-MS に供した。

## 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-1 $\alpha$  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  $\mu$ M 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、HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1 の発現量を評価した。

各細胞群を培地で培養し、定常時の HO-1 発現を評価した。酸化ストレスとして、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 ; 20 nM)、Chloroquine (CHQ ; 50  $\mu$ M)、Wortmannin (Wor ; 10  $\mu$ M) を、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。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。

## 11. sFlt-1/PlGF 評価

sFlt-1/PlGF は胎盤培養上清を用い、ELISA キットを用い評価した。

### (倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得ないが、動物愛護の精神を遵守しつつ行うものである。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学の各所属研究科の動物実験規程に則り行う。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属部署の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受ける

(関連研究は既に承認を受けている)。

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。

本研究では、ナノマテリアルを使用したか、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、研究を推進するものである。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. 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は想像に難くない。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、高確度な発生毒性評価につながると考えられる。そこで本検討では、子に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) をモデル化学物質として用い、胎盤機能に着目したバルプロ酸の毒性機序解明に向けて、胎盤機能の中でも、胎盤ホルモン産生能と胎盤細胞内へのグルコース取り込み能に着目し、バルプロ酸による影響を評価した。

胎盤は妊娠維持に必須の器官であり、ヒト絨毛性ゴナドトロピン $\beta$  (hCG, gene name; CGB)、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。ヒト胎盤絨毛癌細胞株 BeWo に、細胞内の cyclic AMP 濃度を上昇させる試薬 Forskolin (Frk) を添加し、合胞体栄養膜細胞へと分化を誘導した。その後、VPA を 0.3、0.6、0.9、1.2 mM で 72 時間作用させ、胎盤ホルモンの mRNA 量を real time RT-PCR により解析した。その結果、Frk 処置群では薬剤未処置群と比較して、CGB が有意に発現上昇すること、さらに、バルプロ酸添加群では Frk 処置群と比較して、バルプロ酸の作用濃度依存的に CGB の有意な発現上昇が認められた (図 1A)。また、Frk 処置群と薬剤未処置群を比較した際に *CSH1* の発現変動は認められなかったものの、バルプロ酸添加により Frk 処置群と比較してバルプロ酸の作用濃度依存的に *CSH1* の発現減少が示された (図 1B)。この時、胎盤ホルモンの細胞内タンパク質発現量を Western Blotting により解析したところ、mRNA 量と同様に、VPA 添加群では Frk 処置群と比較して、VPA の作用濃度依存的に hCG $\beta$  の発現上昇が認められた。また、VPA 添加群では Frk 処置群と比較して、VPA の作用濃度依存的に hPL の発現減少が認められた (図 1C)。これらの結果から、VPA が BeWo の胎盤ホルモン産生を攪乱することが示唆された。

さらに、VPA が胎盤の栄養素輸送能に及ぼす影響を評価した。胎児は、ほとんどの栄養素の供給を母体血からの胎盤を介した供給に依存している。そのため、母体血から胎盤への栄養素の取り込みと、胎盤から胎児への栄養素の輸送は胎児の発育に必要な不可欠である。そこで、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 2A)。また、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。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 2B)。従って、VPA は BeWo のグルコース取り込み能を抑制し、その際に、VPA による GLUT1 の発現減少が関与し得ることが示された。

次に、VPA による胎盤ホルモン変動機序の解明を目的に、網羅的な遺伝子発現変動解析 (RNA-seq) を実施した (図 3A)。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 3B)。そこで、VPA を添加した際の HIF-1 $\alpha$  の発現量を解析したところ、HIF-1 $\alpha$  の発現が経時的に減少することが示された (図 4A)。また、RT-PCR により、HIF-1 の下流遺伝子 (*HK2*、*ADM*) 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 4B)。従って、VPA が HIF-1 Pathway を阻害し得ることが示された。

VPA が BeWo の HIF-1 活性を阻害することが示されたため、バルプロ酸による胎盤ホルモン産生への影響が HIF-1 活性阻害を介したものであるか、検証した。BeWo に、Frk を添加し、合胞体栄養膜細胞へと分化を誘導した後、VPA (0.6、0.9 mM) を単独で、または、HIF-1 誘導剤である塩化コバルトと VPA を同時に 72 時間作用させた。VPA と塩化コバルトを共処置した際の胎盤ホルモン産生量を real time RT-PCR により評価したところ、VPA と塩化コバルトの共処置により、VPA 添加による CGB 発現上昇が阻害され、CGB の発現量が減少することが明らかとなった (図 5A)。しかし、VPA と塩化コバルトを共処置しても、*CSH1* の発現は上昇せず、バルプロ酸単独処置群よりも、さらに *CSH1* の発現量が減少することが示された (図 5B)。以上の結果から、VPA は HIF-1 活性阻害を介することで CGB の産生量を変動させることが示唆された。

さらに、VPA と塩化コバルトを共処置した際の BeWo のグルコース取り込み量および GLUT1 発現量を評価したところ、VPA 添加により、Frk 処置群と比べ、グルコース取り込み量が抑制された一方で、VPA と塩化コバルトの共処置により、グルコース取り込み量が Frk 処置群と同程度まで上昇することが示された (図 5C)。また、VPA 添加により Frk 処置群と比べ、GLUT1 の発現量が減少した一方で、VPA と塩化コバルト共処置により GLUT1 の発現量が Frk 処置群と同程度まで上昇した (図 5D)。以上の結果から、VPA は HIF-1 活性阻害を通じて BeWo のグルコース取り込み能抑制および GLUT1 発現量を減少させることが示唆された。今後は、*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。

## 2. NM 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 NM 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 NM 曝露の生体影響評価にいち早く取り組み、これまでに NM 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を明らかとするなど、妊娠期における NM 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、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。

NM のモデルとしては、製造量も多く身の回りに汎用されている非晶質シリカナノ粒子、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 nSP10、nAg10、nAu10 を実験に供した。はじめに合胞体化に対する NM の影響を評価するために、BeWo 細胞株に forskolin と各 NM を共処置した際のヒト絨毛性ゴナドトロピンβ (hCG、gene name; CGB) の遺伝子発現量を解析した。その結果、CGB の mRNA 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 6A)。一方で、forskolin とともに nAu10 (図 6B) を処置した群においては、CGB の mRNA の発現低下は認められなかった。

そこで、実際に 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 μg/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 7A)。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 7B)。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 7C)。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。

### 3. nAg10 がヒストン脱アセチル化酵素におよぼす影響評価

胎盤の発達は胎盤栄養膜細胞が合胞体栄養膜細胞を形成すること (合胞体化) から始まり、合胞体栄養膜細胞は胎児と母体の栄養交換などに関与することで、継続的に妊娠の過程に貢献する。この合胞体化の過程は、エピジェネティックな変化の一つであるヒストンアセチル化による制御を受けることが明らかとされつつある。そこで本検討では、nAg10 曝露による胎盤合胞体化の抑制メカニズムの解明に向けて、ヒストンアセチル化への影響の観点から評価することとした。

nAg10 そのものに対する HDAC (ヒト胎盤および BeWo 細胞で発現が認められ、合胞体化進行過程への関与が知られている HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5 を選択した) の活性変動を評価した。その結果、40 μg/ml において、HDAC1 (図 8A)、HDAC2 (図 8B)、HDAC3 (図 8C)、HDAC4 (図 8D)、HDAC5 (図 8E) いずれの活性も有意に抑制され、処置濃度依存的にその活性が低下することが示された。一方で、昨年度までの検討で合胞体化への影響が認められなかった nAu10 を用い同様の解析を実施したところ、HDAC1 の活性に対する有意な変動は認められなかった (図 9)。さらに、銀ナノ粒子の粒子径の違いによる影響を評価した。なお、銀ナノ粒子はイオンを遊離することが知られていることから、硝酸銀を対照群として用いた。その結果、銀イオン、ならびに、nAg30、nAg70 のいずれも HDAC1 (図 10A)、HDAC5 (図 10B) の活性低下を示すことが明らかとなり、その程度は、銀ナノ粒子の粒子径が大きくなるにつれて減弱する傾向を示した。

今後、nAg10 による HDAC の活性変動が、胎盤の形成と機能維持に影響を与える可能性を追究

するため、BeWo に nAg10 を曝露した際の HDAC 活性への影響と共に、ヒストンアセチル化の変動なども評価していく。さらに、ナノ粒子の素材の違いだけでなく、物性（粒子径など）の違いによる合胞体化への影響についても追究していく。これら検討を通じ、nAg10 の曝露が胎盤栄養膜細胞に及ぼす影響をエピジェネティックな観点からメカニズムを解析することで、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図る。

#### 4. BeWo における nAg10 の細胞内取り込み経路の解明

合胞体化誘導時における nAg10 の細胞内取り込み経路について明らかとすることで、メカニズム解明に資する知見の集積を試みた。まず、nAg10 の細胞内取り込みがエネルギー依存的であるかどうかを検討するために BeWo を 4℃条件で 1 時間培養した後、nAg10 を添加し、さらに 4℃で 3 時間培養した。この時の細胞内銀量を ICP-MS により解析したところ、4℃条件では、37℃条件と比較し、nAg10 の細胞内取り込み量が有意に減少した（図 11A）。従って、nAg10 がエネルギー依存的に細胞内に取り込まれることが示唆された。

エンドサイトーシス経路には、マクロピノサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスといった経路が存在する。そこで、nAg10 の細胞内取り込み経路を精査する目的で、各取り込み経路に対する阻害剤を処置した際の nAg10 の細胞内取り込みを評価した。その結果、EIPA（マクロピノサイトーシス阻害剤）（図 11B）、および、MβCD（カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤）（図 11C）を処置した際には、未処置群と比較し、nAg10 の細胞内取り込み量に有意な変動は認められなかったものの、CPZ（クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤）を処置することで、nAg10 の細胞内取り込み量が有意に減少することが明らかとなった（図 11D）。従って今後は、CPZ を処置してクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害した際の、nAg10 による合胞体化抑制への影響について追究することで、メカニズム解明に資する知見の集積を図る。

#### 5. 銀ナノ粒子曝露が妊娠転帰におよぼす影響評価

本検討では、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 12A）。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 12B）。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 12C）、胎盤重量は nAg10 (0.3125 mg/kg mouse) 投与群において有意に低下した（図 12D）。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、今後は胎盤形成・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する。

#### 6. nAg10 単回尾静脈内投与後のマウス胎盤・胎仔移行量の評価

nAg10 が *in vivo* レベルでも胎盤形成や妊娠結果に影響を及ぼすかについて、妊娠マウスを用いて解析したところ、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。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 の移行量を追究していくことが重要である。そこで本検討では、nAg10 の胎盤や胎仔への移行性を評価した。妊娠 10.5 日目の妊娠マウスに nAg10 (0.078、0.3125、1.25 mg/kg) を尾静脈内より単回投与し、妊娠 15.5 日目に母体血液（図 13A）、胎盤（図 13B）、胎仔（図 13C）を回収し、その銀量を ICP-MS により解析した。その結果、いずれの群においても胎仔中には銀が検出されなかったものの、0.3125 mg/kg 投与群、1.25mg/kg 投与群において、母体血液、胎盤から銀が検出された。従って、高濃度投与群では銀ナノ粒子が胎盤へ移行する可能性が示された。今後、曝露実態を鑑み、経肺（吸入）、経皮、経口曝露後の胎盤・胎仔移行性のみならず、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。

#### 7. 銀ナノ粒子の胎盤透過性評価

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。そこで、物性の異なる NM が胎盤透過性、ならびに、胎児側への移行性に及ぼす影響を評価することで、NM のリスク解析に資

する動態情報の集積を試みた。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 細胞株を播種し、経時的に TEER 値を測定した。TEER 値がプラトーに達したことを確認できた時点で、nAg5 (図 14A)、nAg10 (図 14B)、nAg30 (図 14C)、nAg70 (図 14D) をそれぞれ apical 側に添加した。なお、各銀ナノ粒子の添加濃度は、細胞障害性が認められない 0.0623  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に設定した。添加 0、1、3、6、24、48 時間後に apical 側、basal 側から培地を回収し、各銀ナノ粒子の透過量を算出した。その結果、いずれの粒子径の銀ナノ粒子も apical 側の銀量は減少していたものの、basal 側には移行しないことが示された。従って、本条件では、銀ナノ粒子は JEG-3 単層膜を透過しないものの、絨毛細胞内に取り込まれる可能性が考えられた。

## 8. nSP10 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、nSP10 を 72 時間処置した際の 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 15A)。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 15B)。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 15C)、また、CGB の mRNA の発現量は、forskolin 単独処置群と比較して、nAg10 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 15D)。

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

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 16)。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。

## 9. オートファジーが合胞体化に与える影響評価

これまで我々は、絨毛細胞におけるオートファジー抑制が NM 蓄積に関与することを報告してきた。そこで NM との関連を検討する前段階として、合胞体化におけるオートファジー活性について検討した。トロホブラストの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 BeWo 細胞株に forskolin 25  $\mu\text{M}$  を 72 時間添加し分化・融合を誘導した。またオートファジー抑制剤である Bafilomycin を蛋白回収前に 2 時間添加することでオートファジーフラックスを評価した。未分化群 (forskolin 未処置群) に比し、分化誘導群 (forskolin 処置群) でオートファジーフラックスの低下が認められた (図 17A)。ヒト胎盤から採取した初代絨毛細胞である primary human trophoblast でも同様の結果であり (図 17B)、forskolin によりオートファジー活性は上昇するが、トロホブラストの合胞体化によりオートファジー活性の低下が示唆された。

次にオートファジー調整試薬による合胞体化への影響評価を行った。BeWo 細胞株に forskolin 25  $\mu\text{M}$  を添加するとともに、オートファジー抑制剤である Bafilomycin 20 nM、オートファジー活性剤である Torin 10 nM、Tat-Beclin1 20  $\mu\text{M}$  を添加し、分化の指標として hCG の産生を評価した。Bafilomycin 添加により、細胞内の hCG 低下を認めた。一方で Torin や Tat-Beclin1 では hCG 産生に差は認めなかった (図 17C)。また同様に primary human trophoblast に Bafilomycin を投与し評価したところ hCG の低下を認めた (図 17D)。以上のことから、オートファジー抑制によりトロホブラストの合胞体化における分化阻害が示唆された。一方でオートファジー活性化による分化への影響は示されなかった。さらに、オートファジー抑制がトロホブラストの融合に影響



を及ぼすかを評価するため、細胞免疫染色による fusion index を評価した。BeWo 細胞株に forskolin を添加すると融合細胞数が有意に増加したが、Bafilomycin を同時に添加すると融合細胞数が有意に低下した (図 17E)。以上のことからオートファジー抑制がトロホプラスト合胞体化における融合も阻害することが示された。

これまでもオートファジーが胎盤形成に関与することを報告しており、今後、化学物質とオートファジー活性が如何に胎盤形成・成熟過程に関与し、ヒト病態 (流産、胎児発育不全、妊娠高血圧症候群など) に繋がり得るかも検討を行う。

### 10. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に耐性をもつ

絨毛細胞の種類によって HO-1 発現の違いを評価し、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 18A)。さらに、定常時より HO-1 を高発現している細胞では、低発現細胞に比し、酸化ストレスに耐性を持つことが示唆された (図 18B-E)。

### 11. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はオートファジー活性化を示した (図 19A)。また、それに伴い HO-1 発現も増加した (図 19A、B)。同様の結果は Hch 細胞でも認められた (図 19C)。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 19D)。以上より酸化ストレス H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

### 12. 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

または活性剤が定常的 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 の発現が低下したが、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 20A、B)。さらに別のオートファジー抑制剤である Chloroquine (CHQ) や Wortmannin (Wor) では HO-1 の低下を認めなかった (図 20C、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。

そこで、BAF が実際に酸化ストレス耐性に影響を与えるか評価したところ、BAF の 24 時間前処置が BeWo 細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞増殖抑制をさらに増強させ、OS 耐性を減弱させることが判明した。さらに、HO-1 が sFlt-1 分泌に関与するという過去の報告から、BAF が胎盤における sFlt-1/PlGF に影響を与えるか評価し、正常胎盤において BAF 投与は sFlt-1 増加傾向、PlGF 低下傾向を認め、sFlt-1/PlGF 比は有意な上昇を認めた。

### 13. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置を行ったが、Wild type と同等の HO-1 誘導能を認めた (図 21A)。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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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酸化ストレス誘導機構である 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。BeWo 細胞において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。また、Nrf2 や活性型であるリン酸化 Nrf2 は BAF 投与で減少した。一方で p62 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。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 21B-D)。

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

ヒト胎盤における影響を評価するため、正常産の正常胎盤を採取し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびBAF、CHQを投与した。実際の胎盤においてもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与によりHO-1の誘導が確認された(図22A)。BAF投与では10 nM、20 nMともにHO-1の低下を認めた。CHQ投与では50 μM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22B)。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

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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Sakahashi Y., Yamamoto R., Kitahara G., Izutani R., Tsujino H., Haga Y.,

- Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles decrease human chorionic gonadotropin  $\beta$  expression during syncytialization of BeWo cell., *BPB Reports*, 5(6): 154-8, 2022.
8. 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.
  9. 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.
  10. Ikuno Y., Tsujino H., Haga Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Impact of degradation of polyethylene particles on their cytotoxicity., *Microplastics*, 2(2): 192-201, 2023.
  11. Martin, Watanabe R., Hashimoto K., Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y., Mizuguchi K. : Evidence-based prediction of cellular toxicity for amorphous silica nanoparticles., *ACS Nano*, 17(11): 9987-99, 2023.
  12. Cheng S., Huang Z., Nakashima A., Sharma S. : Gestational Age-Dependent Regulation of Transthyretin in Mice during Pregnancy., *Biology (Basel)*, 12(8): 1048, 2023.
  13. Araishi K., Shima T., Yasuda I., Tsuda S., Morita K., Yamaki-Ushijima A., Nakashima A., Saito S. : Dynamics of neuropilin1 (Nrp1)-positive thymus-derived and Nrp1-negative peripherally induced paternal antigen specific regulatory T cells in the uterus and spleen during pregnancy in mice., *J Reprod Immunol.*, 155: 103792, 2023.
  14. Kitahara G., Higashisaka K., Nakamoto Y., Yamamoto R, Okuno W., Serizawa M., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid induces HIF-1 $\alpha$ -mediated CGB expression elevation and glucose uptake suppression in BeWo cell., *J. Toxicol. Sci.*, 49(2): 69-77, 2024.
  15. Ikuno Y., Tsujino H., Haga Y., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Polyethylene, whose surface has been modified by UV irradiation, induces cytotoxicity: A comparison with microplastics found in beaches., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 277: 116346, 2024.
- 【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. Higashisaka K. : Health effects and safety assurance of nanoparticles in vulnerable generations., *Biol. Pharm. Bull.*, 45(7): 806-12, 2022.
  3. 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.
  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. *Yakugaku Zasshi.* 143(2): 133-8, 2023.
  5. Nakashima A., Furuta A., Yamada K., Yoshida-Kawaguchi M., Yamaki-Ushijima A., Yasuda I., Ito M., Yamashita S., Tsuda S., Yoneda S., Cheng S., Sharma S., Shima T. : The Role of Autophagy in the Female Reproduction System: For Beginners to Experts in This Field., *Biology (Basel).*, 12(3): 373, 2024.
  6. 東阪和馬, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品ナノマテリアルの安全性評価—獲得免疫系を介したハザード解析とその機序解明., *Fragrance Journal.*, 51(7): 25-29, 2023.
  7. 堤 康央, 辻野博文 : マイクロ・ナノプラスチックのヒト健康影響の解明に向けて., *Yakugaku Zasshi.*, 144(2): 163-4, 2024.

8. 辻野博文, 生野雄大, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 環境中の表面性状を模倣した劣化マイクロプラスチックの作製., Yakugaku Zasshi., 144(2): 171-5, 2024.
9. 芳賀優弥, 真鍋颯太, 辻野博文, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 劣化したマイクロプラスチックが示す細胞毒性機序の解明., Yakugaku Zasshi., 144(2): 177-81, 2024.
10. 東阪和馬, 芳賀優弥, 堤 康央: 化学物質の胎盤毒性解析とその評価手法の開発., 細胞., 56(3): 30-4, 2024.

## 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～)
5. 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)
6. 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)
7. 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.
8. 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.
9. 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)
10. 東阪和馬: ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性研究の現状と今後. ナノインク懇話会, 大阪(大阪), 2023年6月.
11. 東阪和馬: 脆弱な世代に対する金属ナノ粒子の健康影響評価と安全性確保に向けて., メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜(岐阜), 2023年10月. (シンポジウム: 微小金属粒子のバイオサイエンス: 測定から生体応答まで)
12. 堤 康央: 微粒子との環境共生に向けて., 日本薬学会第144年会., 横浜(神奈川), 2024年3月. (シンポジウム: 微粒子との環境共生研究 up-to-date 2024)
13. 東阪和馬: ヒトと微粒子との環境共生に向けたナノマテリアルの物性とハザード発現との連関解析., 日本薬学会第144年会., 横浜(神奈川), 2024年3月. (シンポジウム: 微粒子との環境共生研究 up-to-date 2024)
14. 東阪和馬: 脆弱世代の健康確保に向けた化学物質の胎盤毒性解析., 日本薬学会第144年会., 横浜(神奈川), 2024年3月. (シンポジウム: 胎盤機能に関する基礎・臨床的研究と創薬研究への展開)
15. 芳賀優弥: 多種多様なマイクロプラスチックによる毒性発現機序の理解., 日本薬学会第144年会., 横浜(神奈川), 2024年3月. (シンポジウム: マイクロ・ナノプラスチック研究の最前線-ヒトリスク評価に向けた取り組みと課題-)

### 【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. 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, Tokyo (Tokyo), 29-30 October, 2021.
  5. 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., オンライン, 2021 年 11 月.
  6. 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., 奈良 (奈良), 2021 年 12 月.
  7. 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ポーター発現に対するバルプロ酸の影響解析., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2022 年 6 月.
  16. 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.
  17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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., 松江 (島根), 2022年10月.
23. 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., オンライン, 2022年10月.
24. 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: シンシチオトロホブラスト層に着目した化学物質の胎盤透過性評価に適う 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.
25. 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., 高知 (高知), 2022年11月.
26. 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., 金沢 (石川), 2022年11月.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 東阪和馬, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 食品関連製品に含まれるナノマテリアルの神経細胞分化への影響解析., 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
31. 泉谷里奈, 東阪和馬, 坂橋優治, Seo Jiwon, 宮地一輝, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央: ナノマテリアル曝露が妊娠準備から着床期に及ぼす影響評価., 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
32. 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: 非晶質ナノシリカ曝露による胎盤炎症応答の解析., 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
33. 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 山本怜奈, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: バルブロ酸が胎盤機能へ及ぼす影響評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈

- 川) , 2023 年 6 月.
34. 仲本有里菜, 東阪和馬, 北原 剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : バルプロ酸が胎盤のトリプトファン輸送トランスポーターに与える影響評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川) , 2023 年 6 月.
  35. 奥村 萌, 芳賀優弥, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカ粒子の細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川) , 2023 年 6 月.
  36. Seo Jiwon, 東阪和馬, 坂橋優治, 泉谷里奈, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : ナノマテリアル曝露による合胞体化抑制のエピジェネティックな観点からのメカニズム解析., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川) , 2023 年 6 月.
  37. 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 : 紫外光により劣化したマイクロプラスチックはオートファジー依存的な細胞死を誘導する., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川) , 2023 年 6 月.
  38. 東阪和馬, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性確保に向けた胎盤細胞合胞体化への影響解析., 第 48 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2023 年 6 月.
  39. 小林純大, 東阪和馬, 謝 燕坤, 奥野和香子, 村中瑞希, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカ粒子の胎盤透過性及び胎盤細胞取り込み評価., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫) , 2023 年 10 月.
  40. 出原若葉, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 真鍋颯太, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央 : 劣化したマイクロプラスチックの細胞内取り込み機構の解明に向けた検討., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫) , 2023 年 10 月.
  41. 奥野和香子, 東阪和馬, 小林純大, 謝 燕坤, 村中瑞希, 芳賀優弥, 堤 康央 : Forskolin 誘導性の BeWo 細胞合胞体化過程に対するバルプロ酸の影響評価., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫) , 2023 年 10 月.
  42. 東阪和馬, 坂橋優治, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央 : 胎盤細胞の合胞体化に着目したナノ粒子の安全性評価研究., 第 31 回日本胎盤学会学術集会., 福岡 (福岡) , 2023 年 11 月.
  43. 佐伯悠真, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 宮地一輝, 芳賀優弥, 堤 康央 : 銀ナノ粒子の雄親曝露が妊娠転帰に及ぼす影響の評価., 日本薬学会第 144 年会., 横浜 (神奈川) , 2024 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.
2. 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, Nashville (USA), 22-25 May, 2022.
3. 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.
4. 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.
5. 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 XVth International Congress of Toxicology, Maastricht (Netherlands), 18-21 September, 2022.

6. 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.
  7. 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.
  8. Higashisaka K., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppress forskolin-induced syncytialization in BeWo cells., The 10<sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
  9. Haga Y., Okumura M., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Cellular uptake and distribution after intranasal administration of amorphous silica nanoparticle., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
  10. Manabe S., Haga Y., Tsujino H., Asahara H., Ikuno Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The mechanisms of autophagy-dependent cell toxicity caused by degraded microplastics., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
  11. Higashisaka K., Kitahara G., Nakamoto Y., Yamamoto R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid induces HIF-1 $\alpha$ -mediated CGB expression elevation and glucose uptake suppression in BeWo cell., 57<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Ljubljana (Slovenia), 10-13 September, 2023.
  12. Kobayashi J., Higashisaka K., Xie Y., Okuno W., Haga Y., Suzuki R., Utoguchi N., Tsutsumi Y. : Cellular uptake and permeability of silica particles with different size in placental cells, 2023 international joint meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Shizuoka (Shizuoka), 26-29 September, 2023.
  13. Higashisaka K., Kitahara G., Nakamoto Y., Yamamoto R., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid elevates HIF-1 $\alpha$ -mediated CGB expression and suppresses glucose uptake in BeWo cells., AAPS 2023 PharmSci 360, Orlando (USA), 22-25 October, 2023.
  14. Haga Y., Okumura M., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The effect and distribution of amorphous nanosilica particle in the brain and microglial cells., AAPS 2023 PharmSci 360, Orlando (USA), 22-25 October, 2023.
  15. Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y. : Cell-mediated immunity exacerbates amorphous silica nanoparticles-induced hepatic damage., American College of Toxicology 2023 Annual Meeting, Orlando (USA), 12-15 November, 2023.
  16. Haga Y., Manabe S., Tsujino H., Ikuno Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The Mechanisms of Degraded Microplastics-Induced Cell Toxicity., American College of Toxicology 2023 Annual Meeting, Orlando (USA), 12-15 November, 2023.
- 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



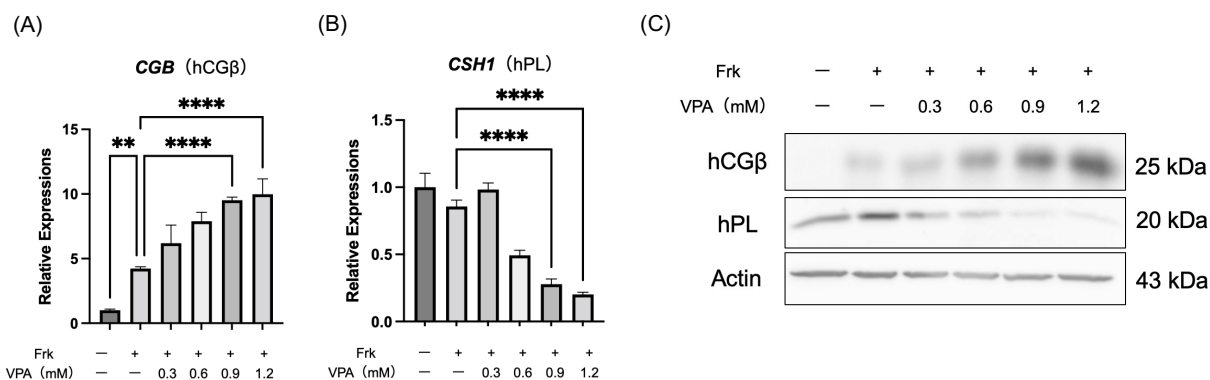


図1 : VPAがBeWoにおける胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価

BeWo細胞株に50 μM forskolin (Frk) を添加した24時間後に、バルプロ酸 (VPA) を添加して72時間培養した。培養後の細胞を回収し、(A) CGB、(B) CSH1のmRNA発現量をreal time RT-PCRにより解析した。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 ± SD (n = 3) . \*P < 0.05 by Tukey's method. (C) hCGβ、hPLの産生量をwestern blottingにより解析した。

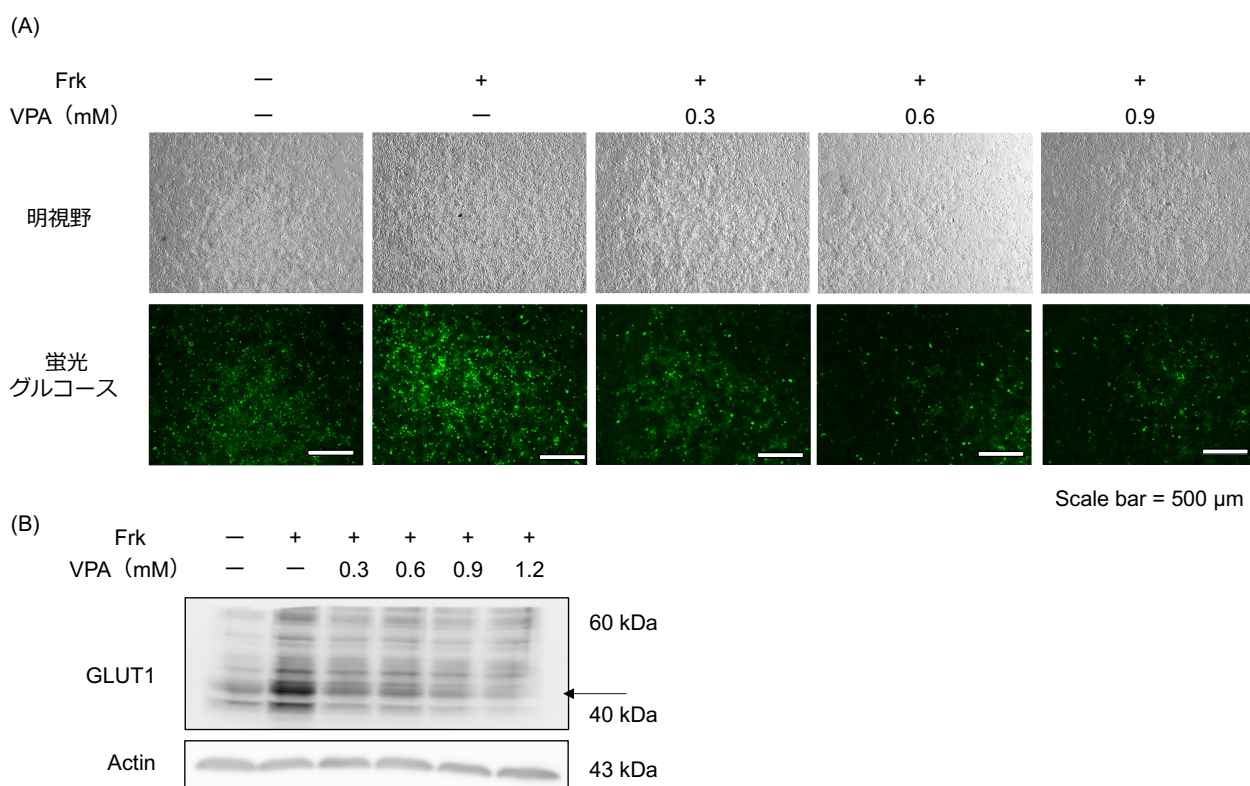
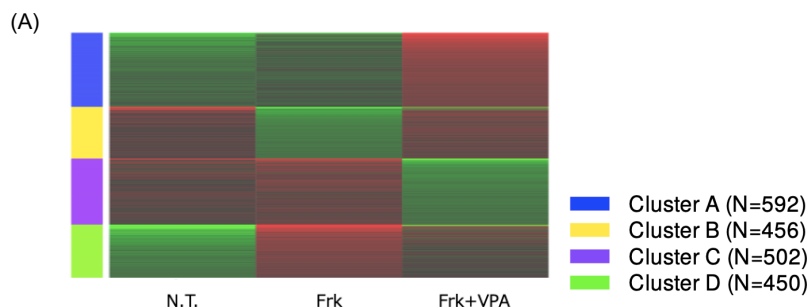


図2 : VPA曝露がBeWoにおけるグルコース取り込みにおよぼす影響評価

未分化のBeWoに50 μM 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。(B) 回収した細胞からタンパク質を抽出し、GLUT1の発現量をWestern Blottingにより解析した。



(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

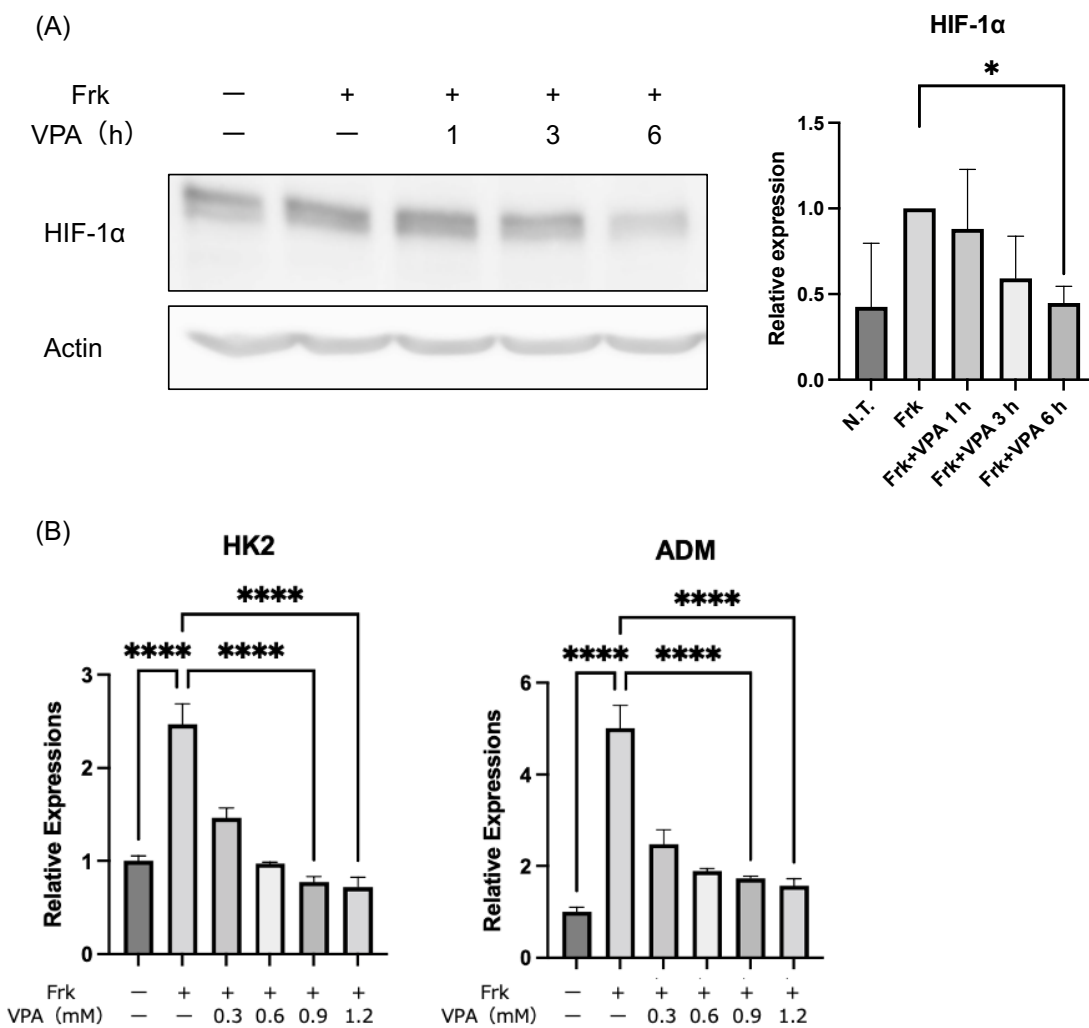
	Term	q-value
1	HIF-1 transcriptional activity in hypoxia	7.42E-06
2	Interleukin-2 signaling pathway	2.33E-05
3	BDNF signaling pathway	3.46E-05
4	EGFR1 pathway	1.26E-04
5	Interleukin-4 regulation of apoptosis	1.29E-04
6	Gastrin pathway	3.79E-04
7	Oncostatin M	0.00321
8	TSH regulation of gene expression	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

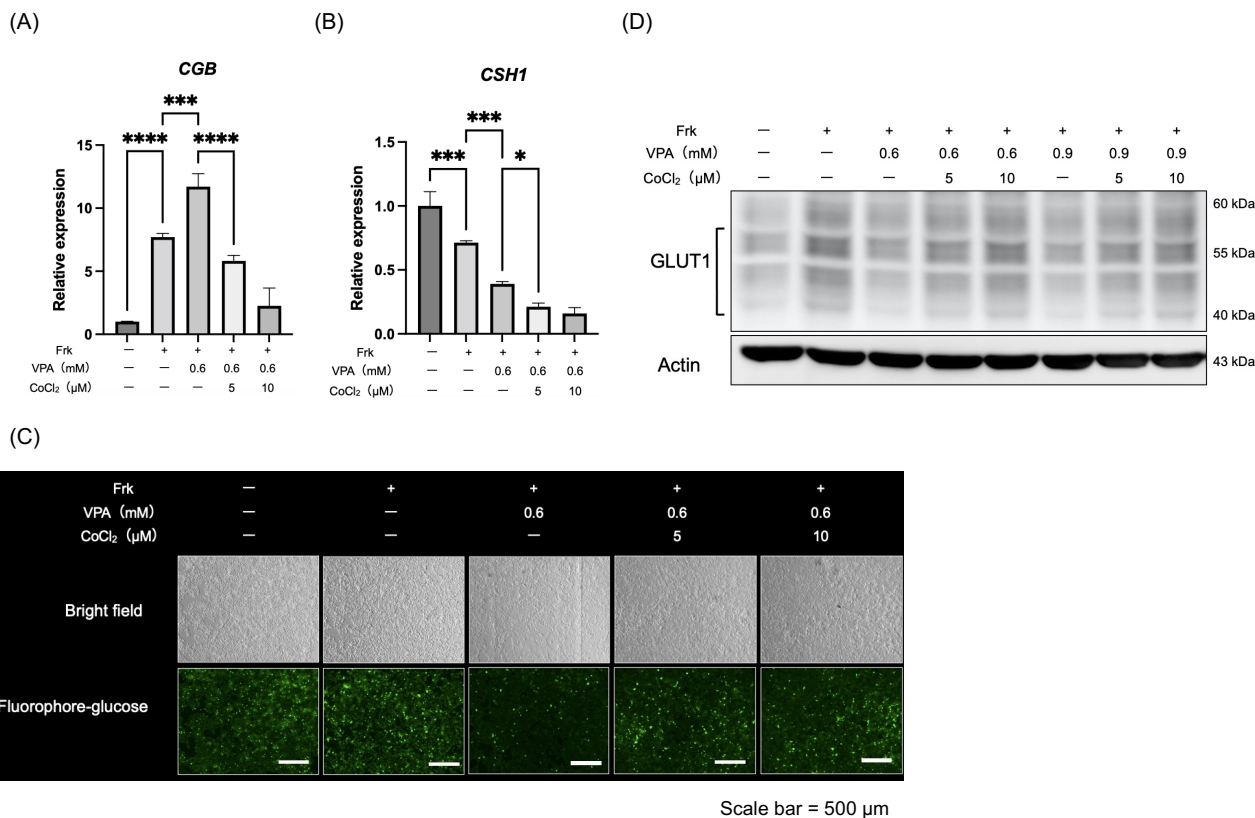
図3 : VPA曝露後のBeWoにおける発現変動遺伝子の網羅的な解析

未分化のBeWoに50  $\mu$ 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。

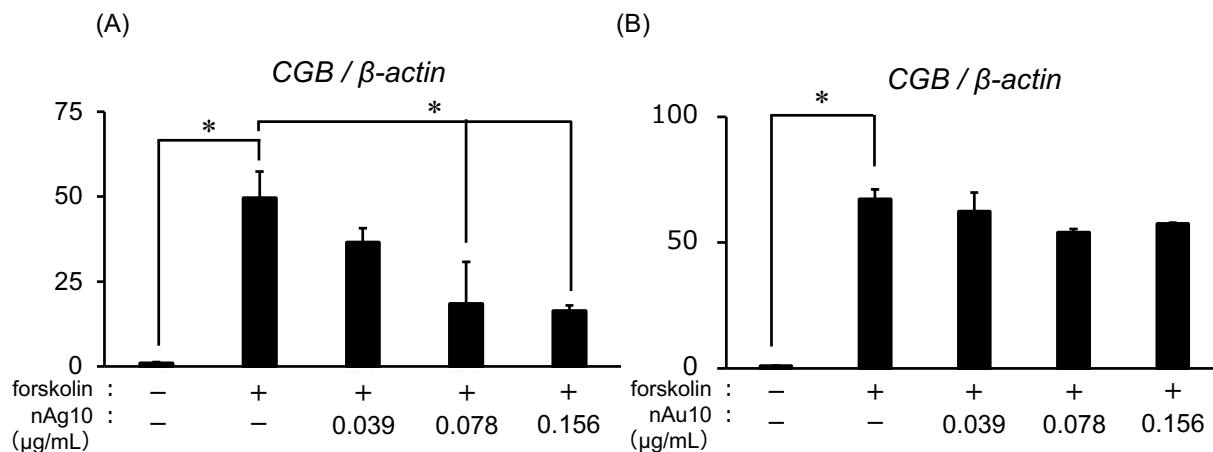


**図4 : VPAによるHIF-1α、および、HIF-1下流遺伝子の変動評価**

未分化のBeWoに50  $\mu$ 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) 回収した細胞からタンパク質を抽出し、HIF-1 $\alpha$ の発現量をWestern Blottingにより解析した。(B) 未分化のBeWoに50  $\mu$ 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5 : VPA曝露後の胎盤ホルモン産生、グルコース取り込みに対するHIF-1活性阻害の影響解析**  
 BeWoに、Frkを添加し、合胞体栄養膜細胞へと分化を誘導した後、VPA (0.6、0.9 mM) を単独で、または、VPA (0.6、0.9 mM) と塩化コバルト (5、10 μM) を同時に72時間作用させた。培養後の細胞を回収し、(A) *CGB*、(B) *CSH1*のmRNA発現量をreal time RT-PCRにより解析した。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 ± SD (n = 3) . \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001 \*\*\*\**P* < 0.0001 by Tukey's method. (C) 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。(D) 回収した細胞からタンパク質を抽出し、GLUT1の発現量をWestern Blottingにより解析した。



**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、(B) nAu10を0、0.039、0.078、0.15 μg/mLの濃度で50 μM 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 by Tukey's method.

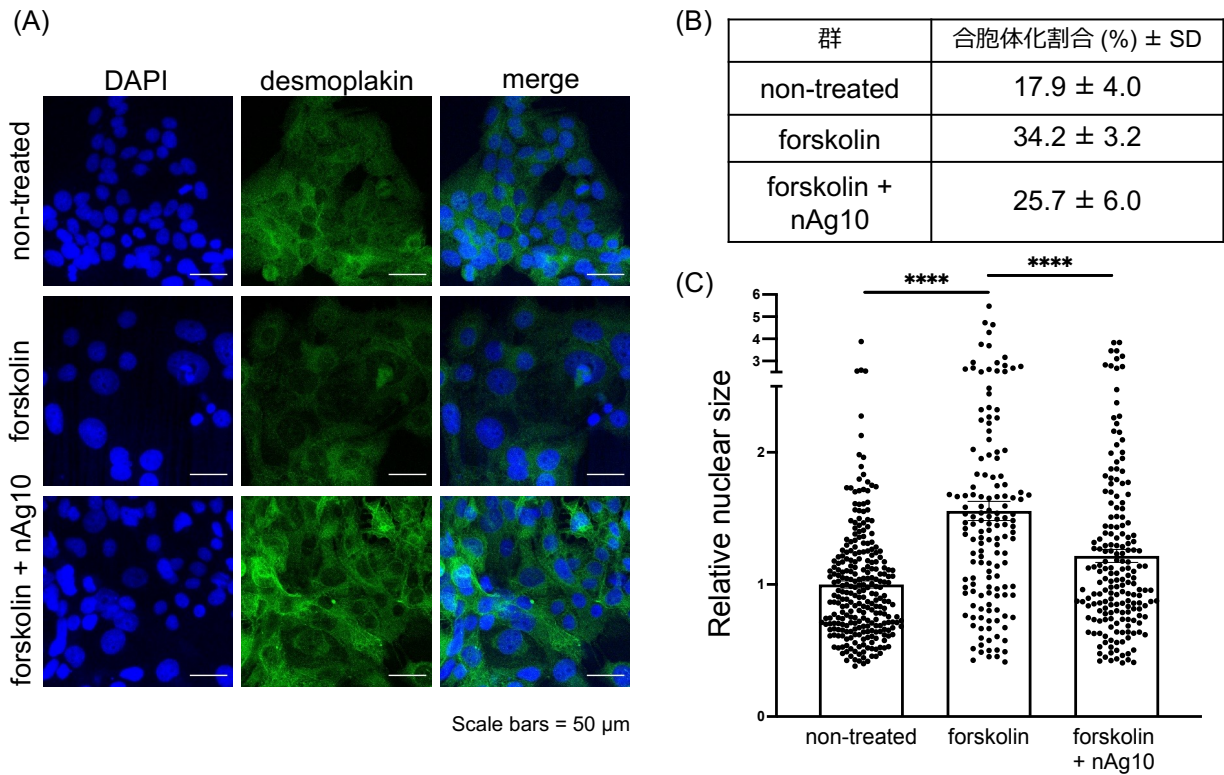


図7：合胞体栄養膜細胞の形態評価および合胞体化割合の算出

(A) BeWo細胞株に、nAg10を0、0.039  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で50  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{m}$  (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)  $\times$  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.

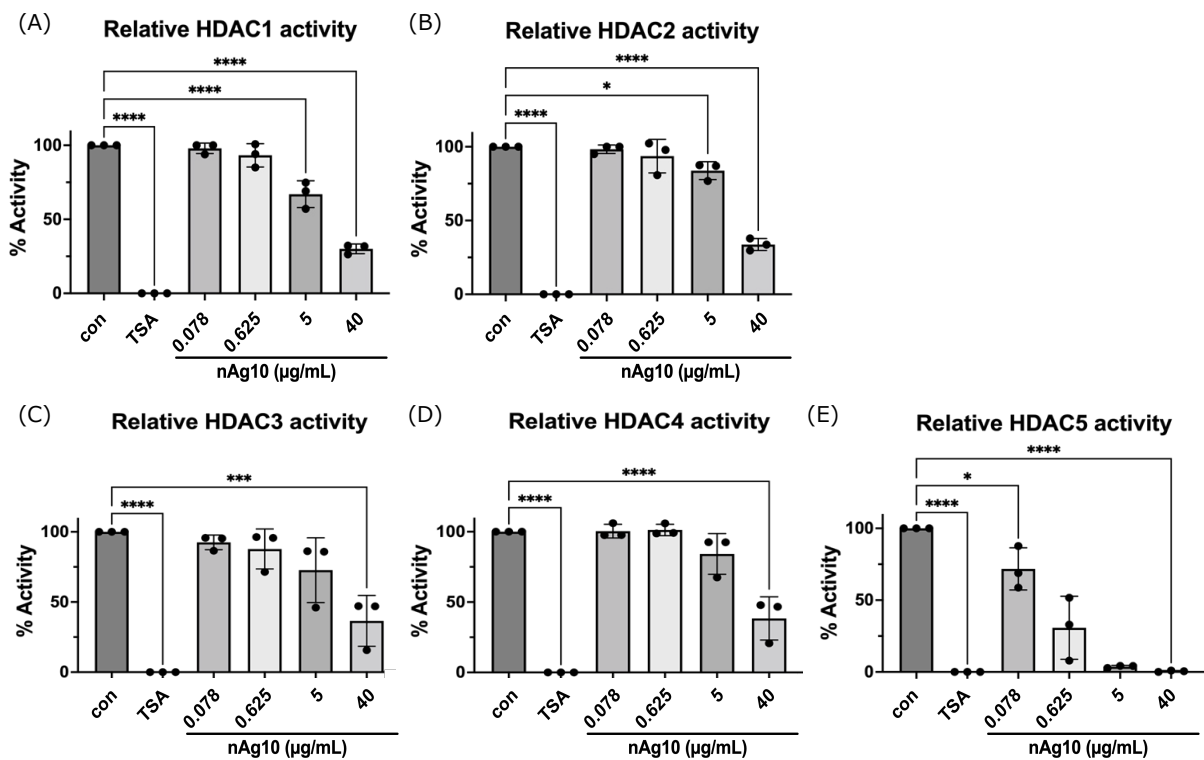


図8：nAg10がヒストン脱アセチル化酵素の活性におよぼす影響評価  
 nAg10による (A) HDAC1、(B) HDAC2、(C) HDAC3、(D) HDAC4、(E) HDAC5の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。各群のHDAC活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準して比較した。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  by Dunnett's method.

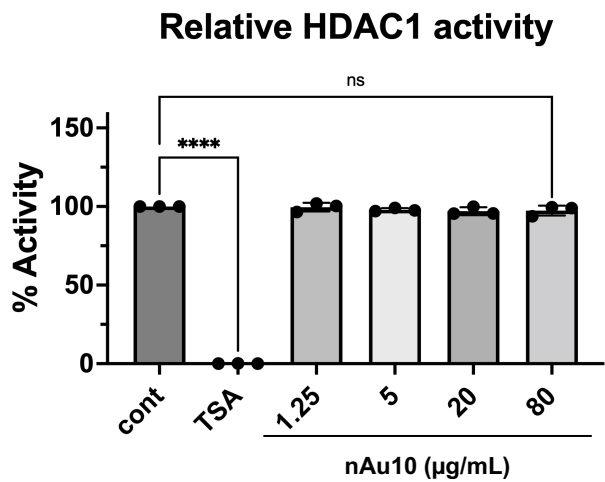


図9：nAu10がヒストン脱アセチル化酵素1の活性におよぼす影響評価  
 nAu10によるHDAC1の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。HDAC1活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準して比較した。ns: not significant, \*\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  by Dunnett's method.

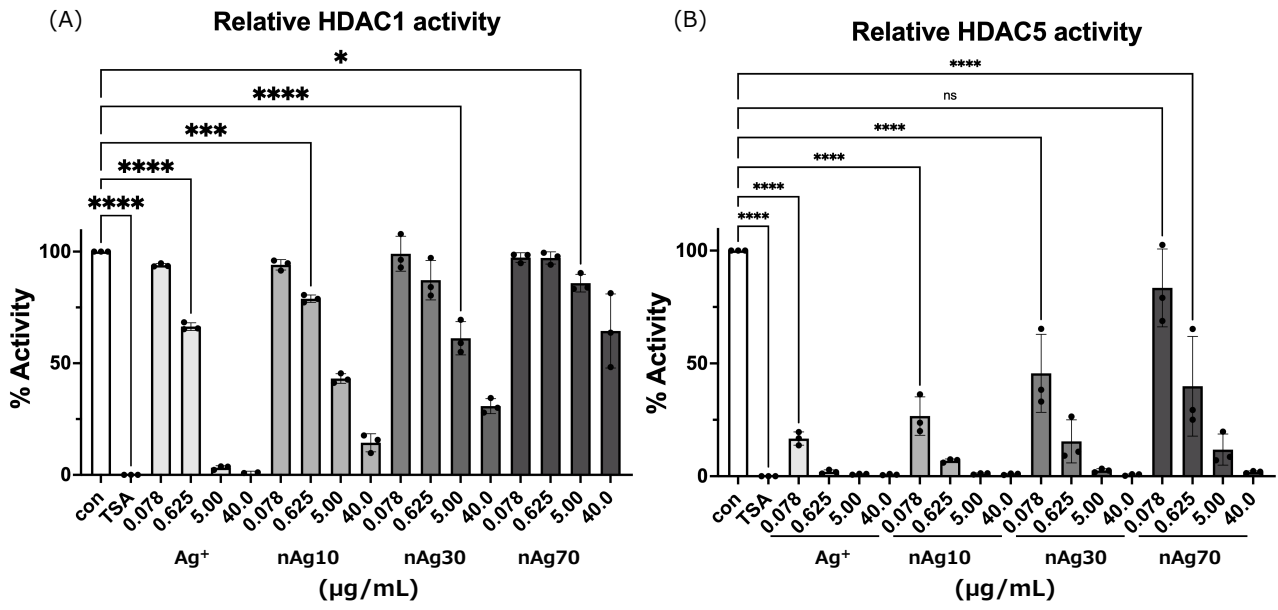
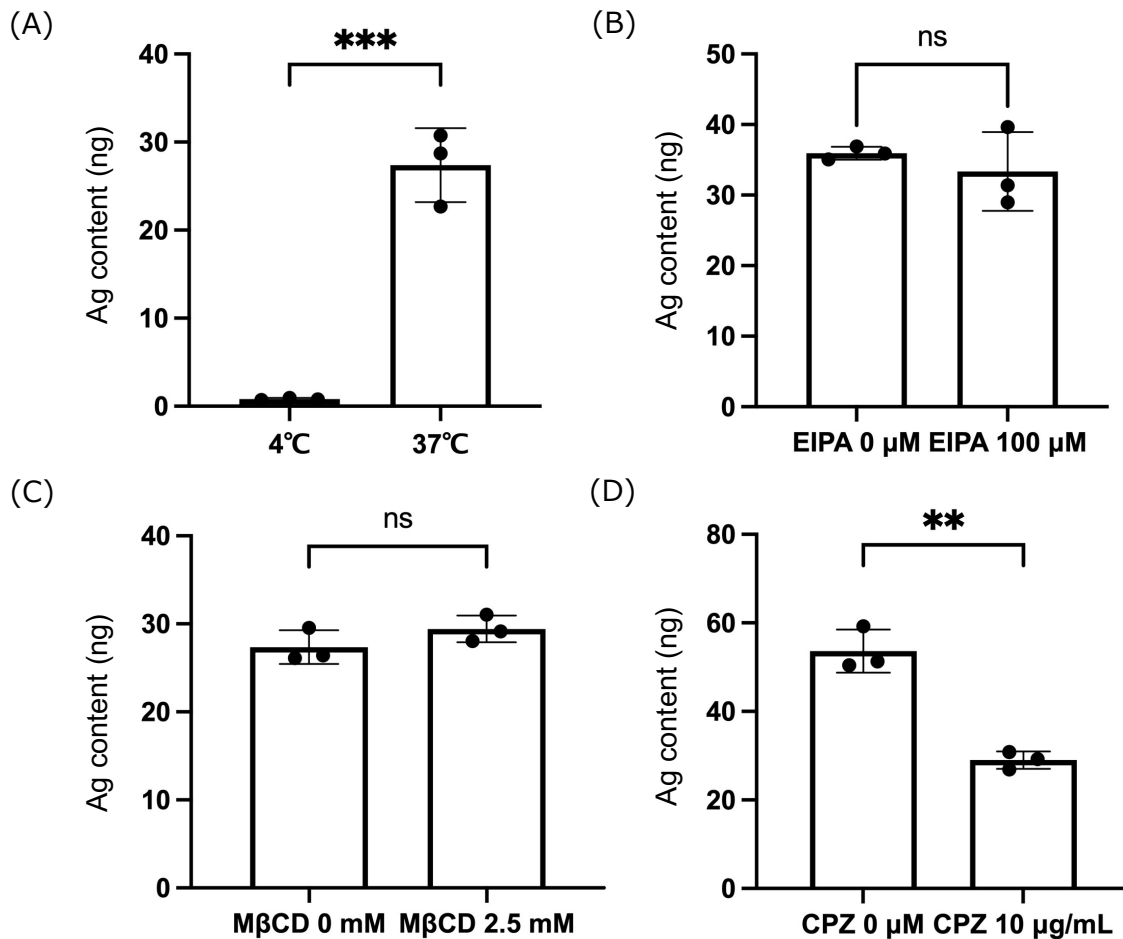


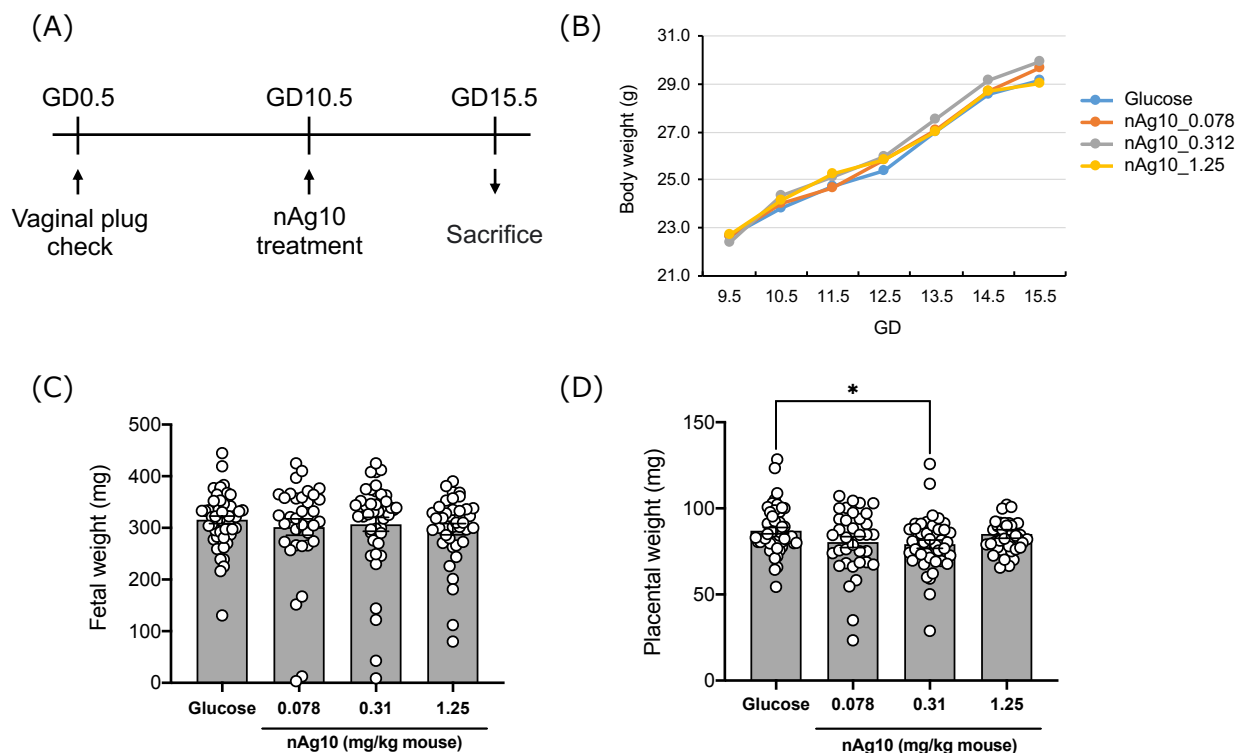
図10 : Ag<sup>+</sup>、nAg10、nAg30、nAg70がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1、HDAC5) の活性におよぼす影響評価  
 Ag<sup>+</sup>、nAg10、nAg30、nAg70による (A) HDAC1、(B) HDAC5の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。各群のHDAC活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準して比較した。ns: not significant, \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 by Dunnett's method.



**図11 : BeWoにおけるnAg10の細胞内取り込み経路の解明**

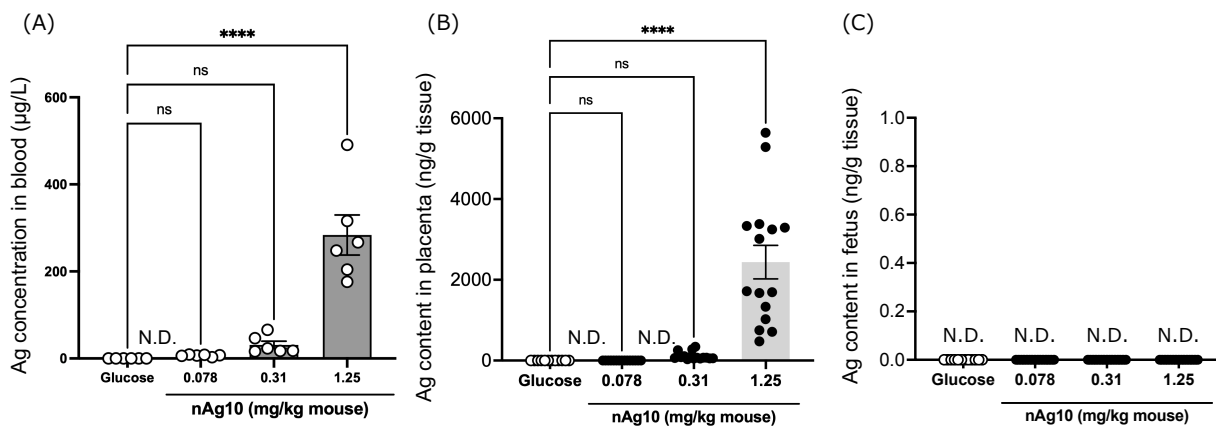
(A) BeWoを4°C条件で1時間培養した後、nAg10 (0.156 μg/mL) を添加し、さらに4°Cで3時間培養した。(B) 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) を終濃度100 μMにて3時間添加した後、終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。(C) Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を終濃度2.5 mMで1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。(D) Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) を終濃度10 μg/mLで1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。その後、細胞を回収し、細胞内銀量をICP-MSにより測定した。Data are presented as mean ± SD (n = 3). ns, not significant, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 by student's t-test.





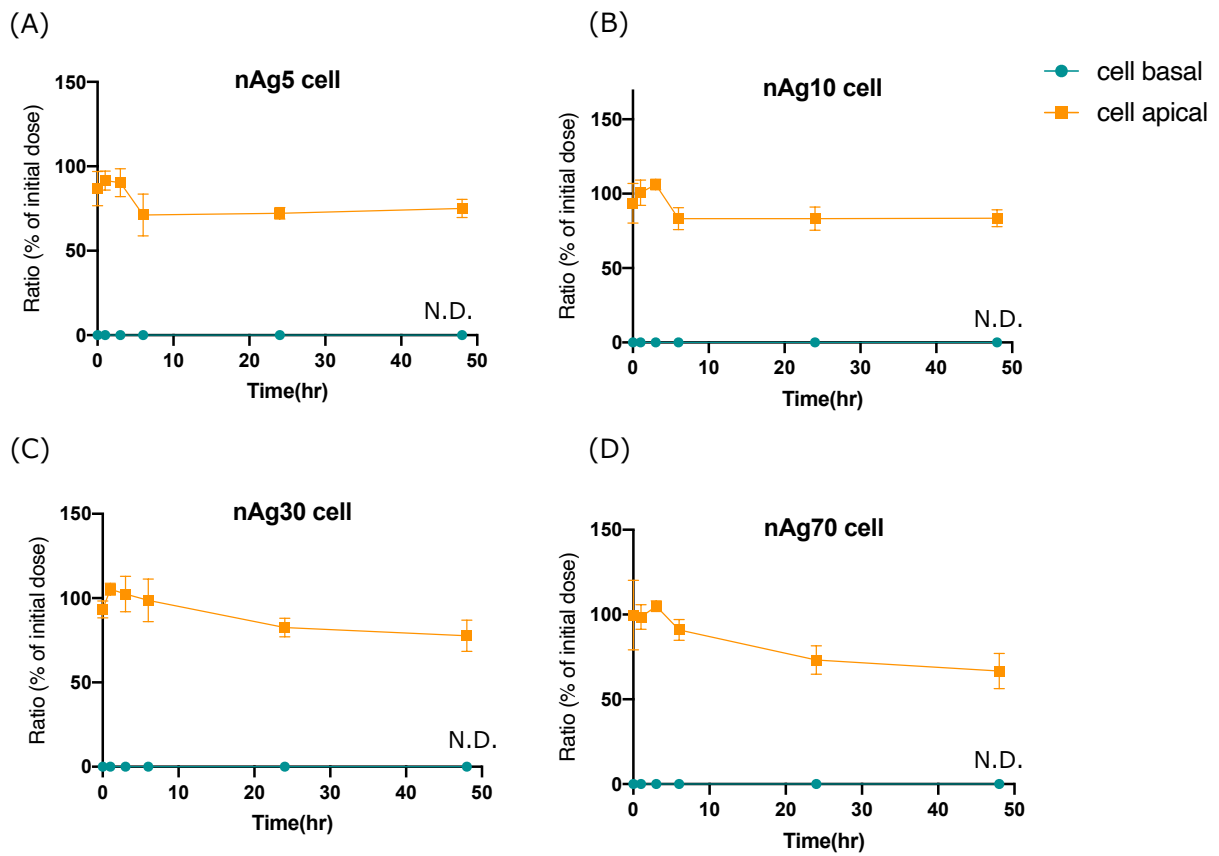
**図12：妊娠マウスへのnAg10単回投与の影響評価**

(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13：妊娠マウスへのnAg10単回投与後の胎盤、胎児移行性**

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) を尾静脈内より単回投与し、妊娠15.5日目に解剖を行い、(A) 血液、(B) 胎盤、(C) 胎仔における銀量をICP-MSにより測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM. N.D., not detect, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 by dunnett-test (N.D.を0として統計解析を実施)



**図14：銀ナノ粒子のJEG-3単層膜透過性の評価**

JEG-3をセルカルチャーインサートに播種し、培養することで、単層膜を形成させた。TEER値がプレートに達したことを確認できた時点で、細胞障害性の認められない0.0625 $\mu$ g/mlの濃度で、(A) nAg5、(B) nAg10、(C) nAg30、(D) nAg70をapical側に添加し、添加から0、1、3、6、24、48時間後にサンプリングした。Apical側、Basal側の銀量をICP-MSにより測定し、0時間におけるapical側の銀量を100%としてapical側、basal側の銀量の割合を算出した。Data are presented as mean  $\pm$  SD (n=3).

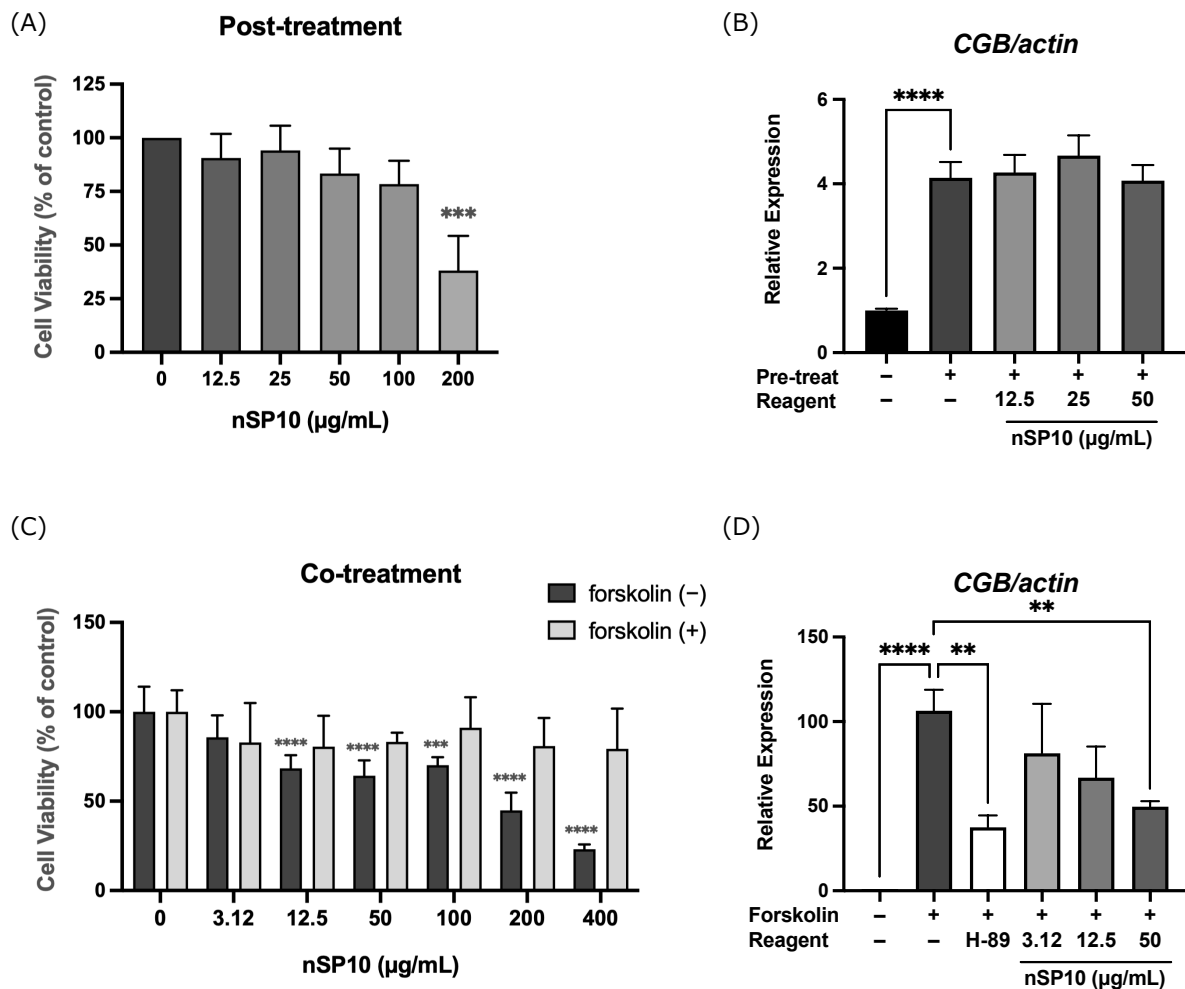


図15 : nSP10による細胞障害性とCGBの発現変動評価

(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.

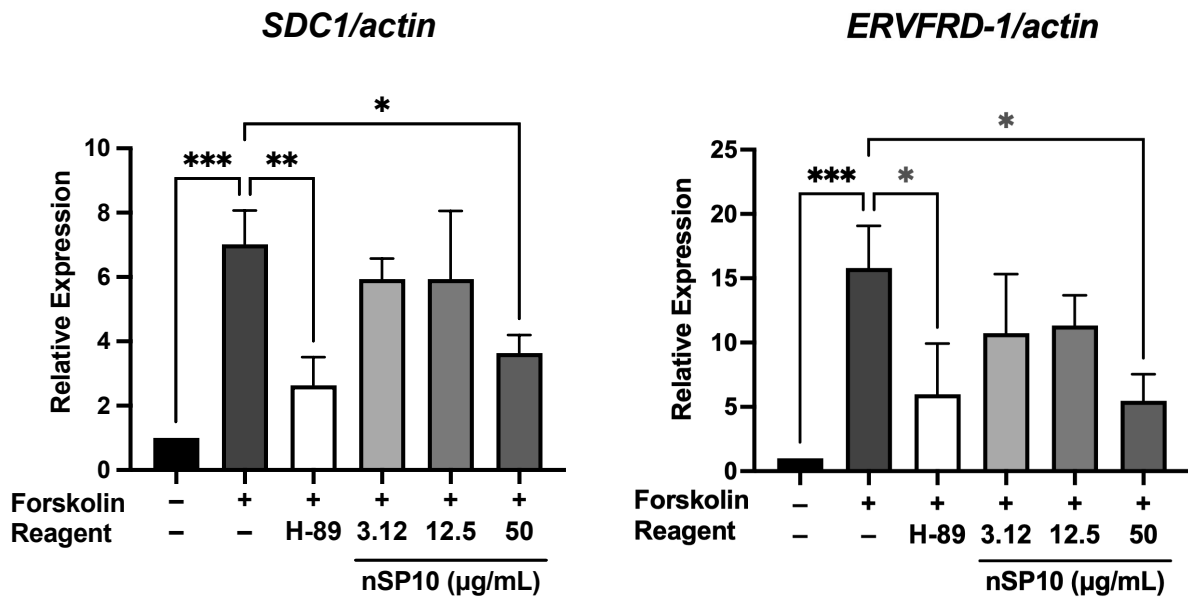
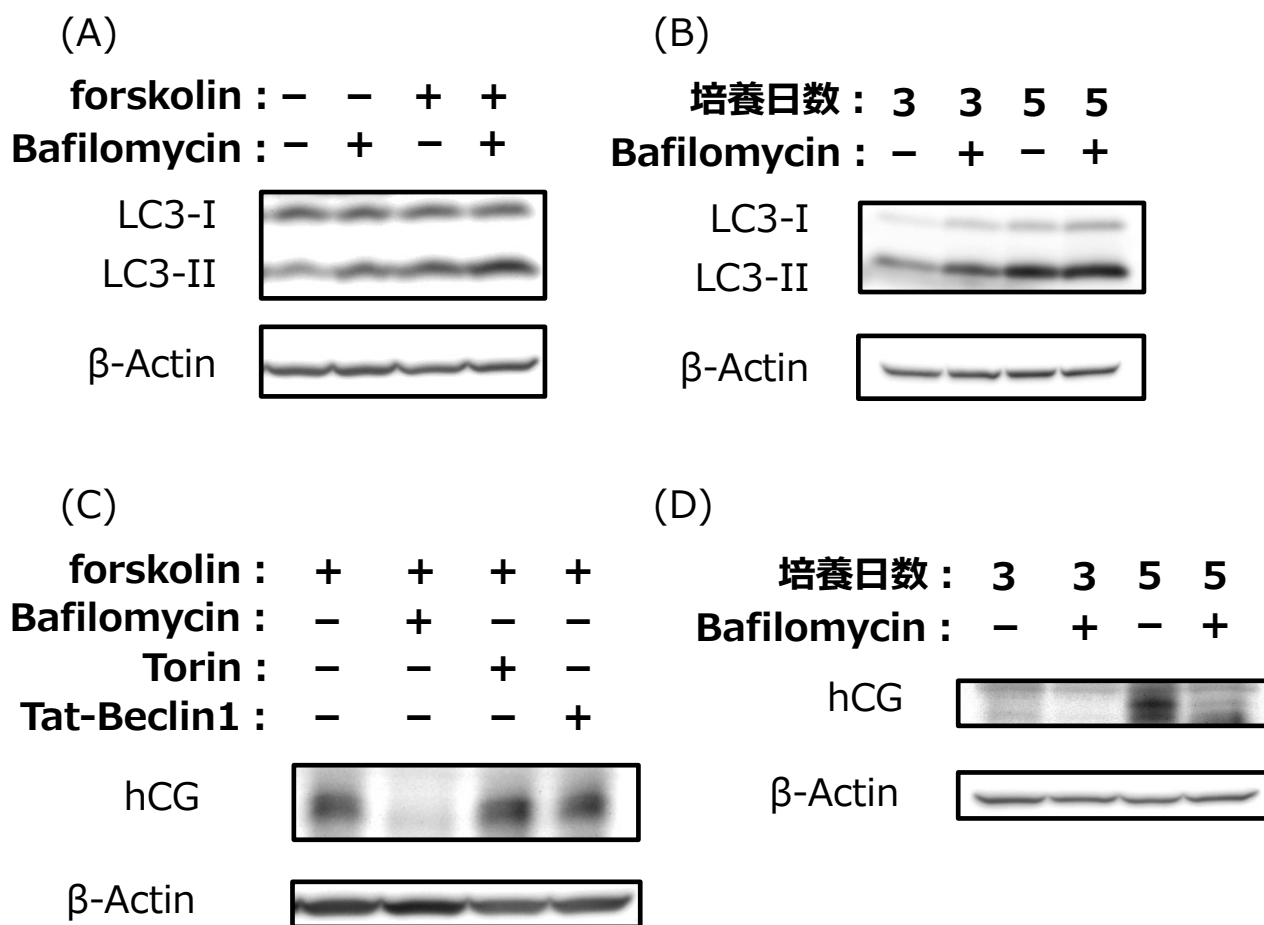


図16 : nSP10処置時の合胞体化関連遺伝子の発現評価

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) . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



(E) <fusion index>

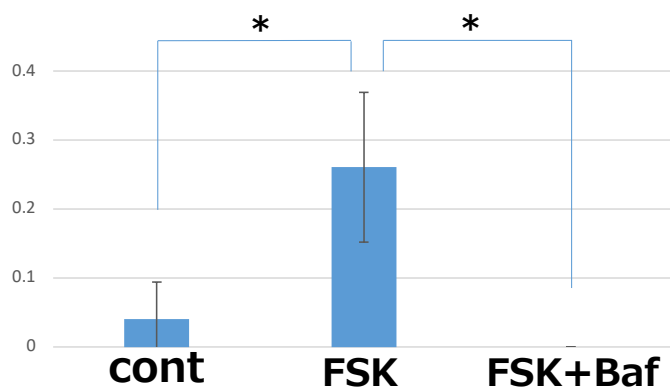


図17：オートファジーが合胞体化に与える影響評価

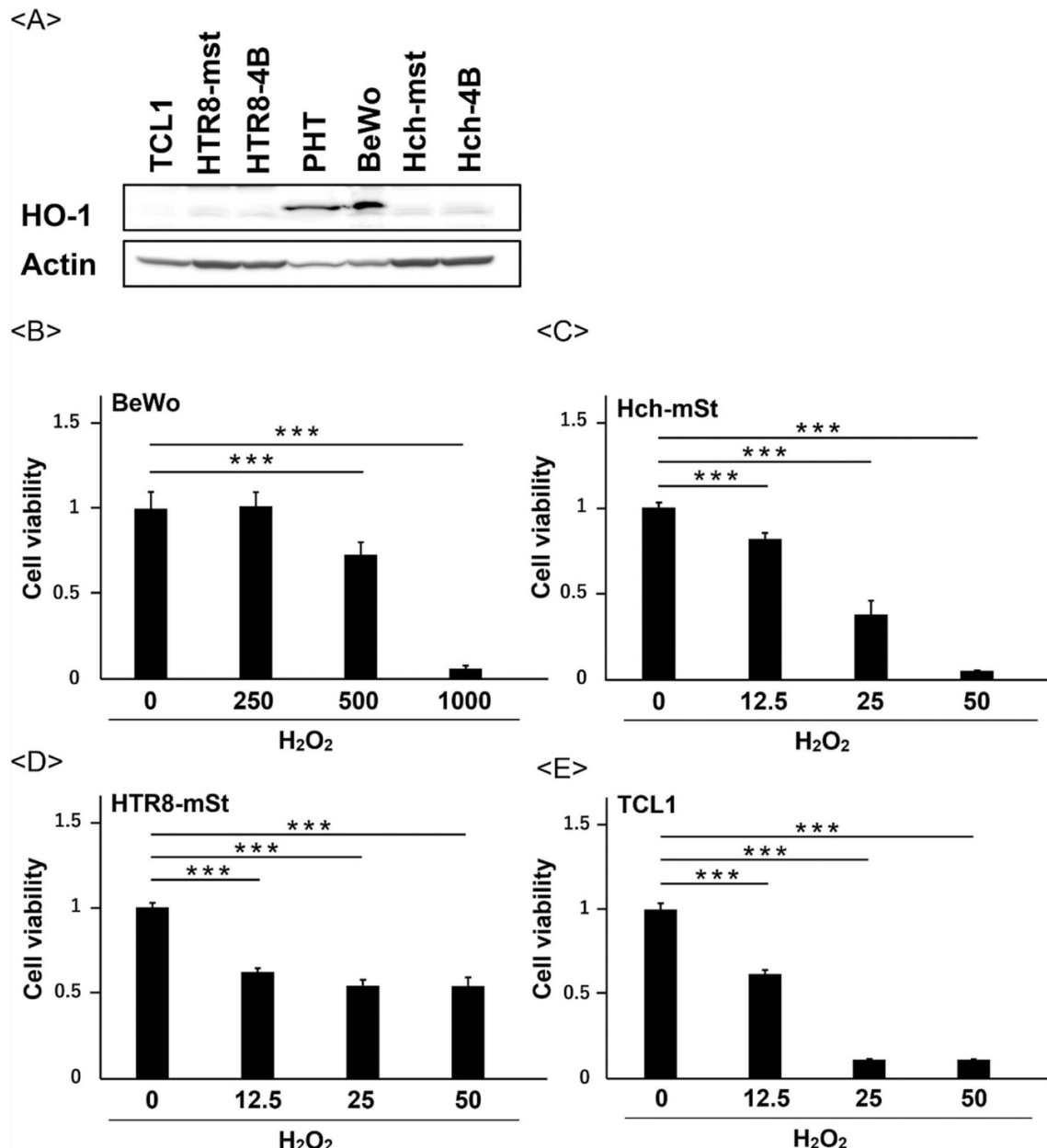
(A) BeWo細胞株にforskolin (25  $\mu$ M) を72時間処置し合胞体化を誘導した。オートファジーフラックスの確認のため蛋白回収前2時間にBafilomycin (20 nM) を処置した。コントロールはDMSO処置とした。

(B) Primary human trophblastを培養し合胞体化を誘導した。オートファジーフラックスの確認のため蛋白回収前2時間にBafilomycin (20 nM) を処置した。コントロールはDMSO処置とした。

(C) BeWo細胞株にforskolin (25  $\mu$ M) を72時間処置し合胞体化を誘導した。forskolinとともにbafilomycin (20 nM)、Torin (10 nM)、Tat-Beclin1 (20  $\mu$ M) を処置した。

(D) Primary human trophblastを培養し合胞体化を誘導した。培養2日目よりBafilomycin (20 nM) を処置し、培養3日目と5日目に蛋白を回収した。

(E) BeWo細胞株にforskolin (25  $\mu$ M) とともにBafilomycin (20 nM) を72時間処置し、生細胞染色を実施した。共焦点顕微鏡 (LSM 700 ; ZEISS) により蛍光画像を撮影した。細胞膜をDi-8-ANEPS、核をDAPIで染色した。撮影した蛍光画像をもとにfusion index (融合細胞の核数/総核数) を計算した。各群それぞれ6視野を撮影し解析に用いた。\*P<0.05



**図18：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) HTR-mSt細胞、および(E) TCL1細胞を様々な濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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。

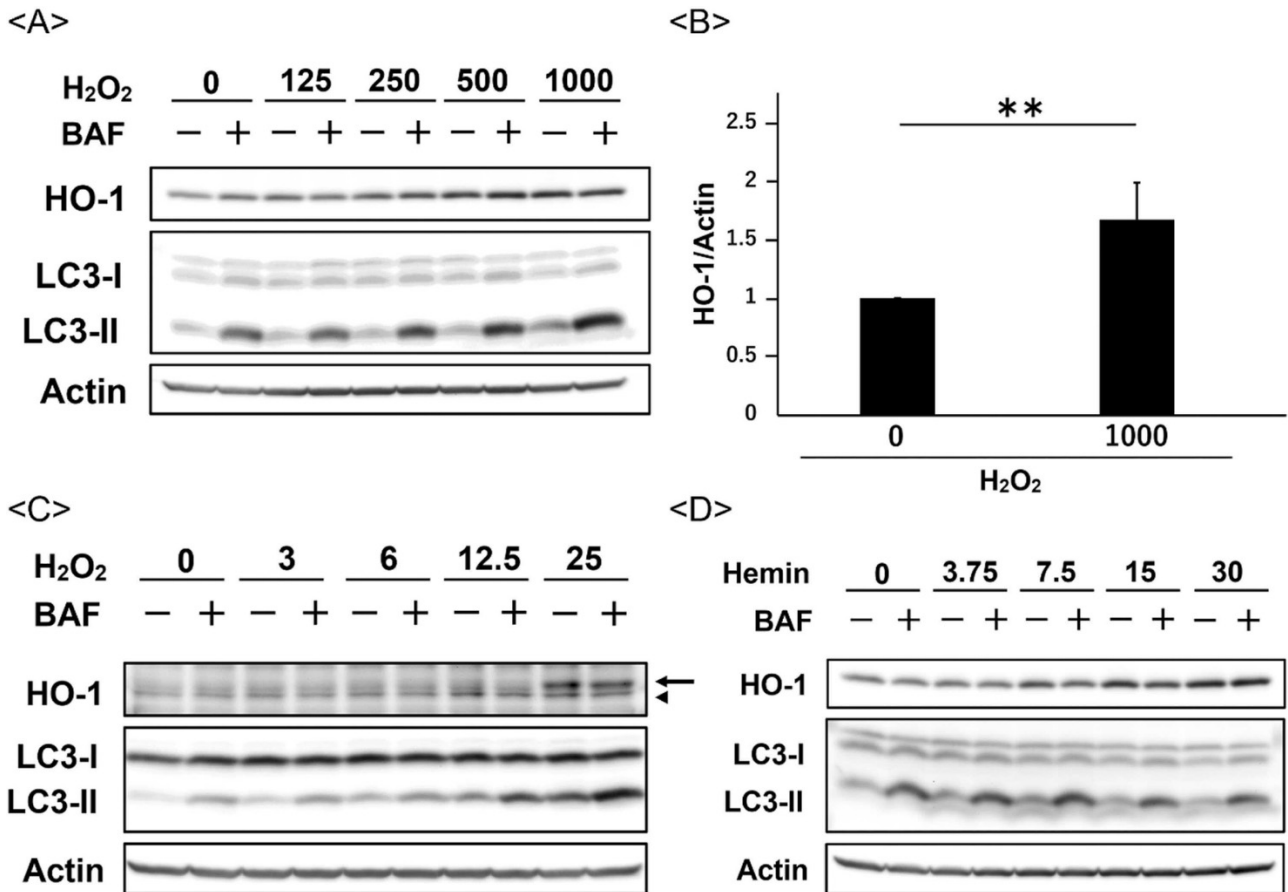
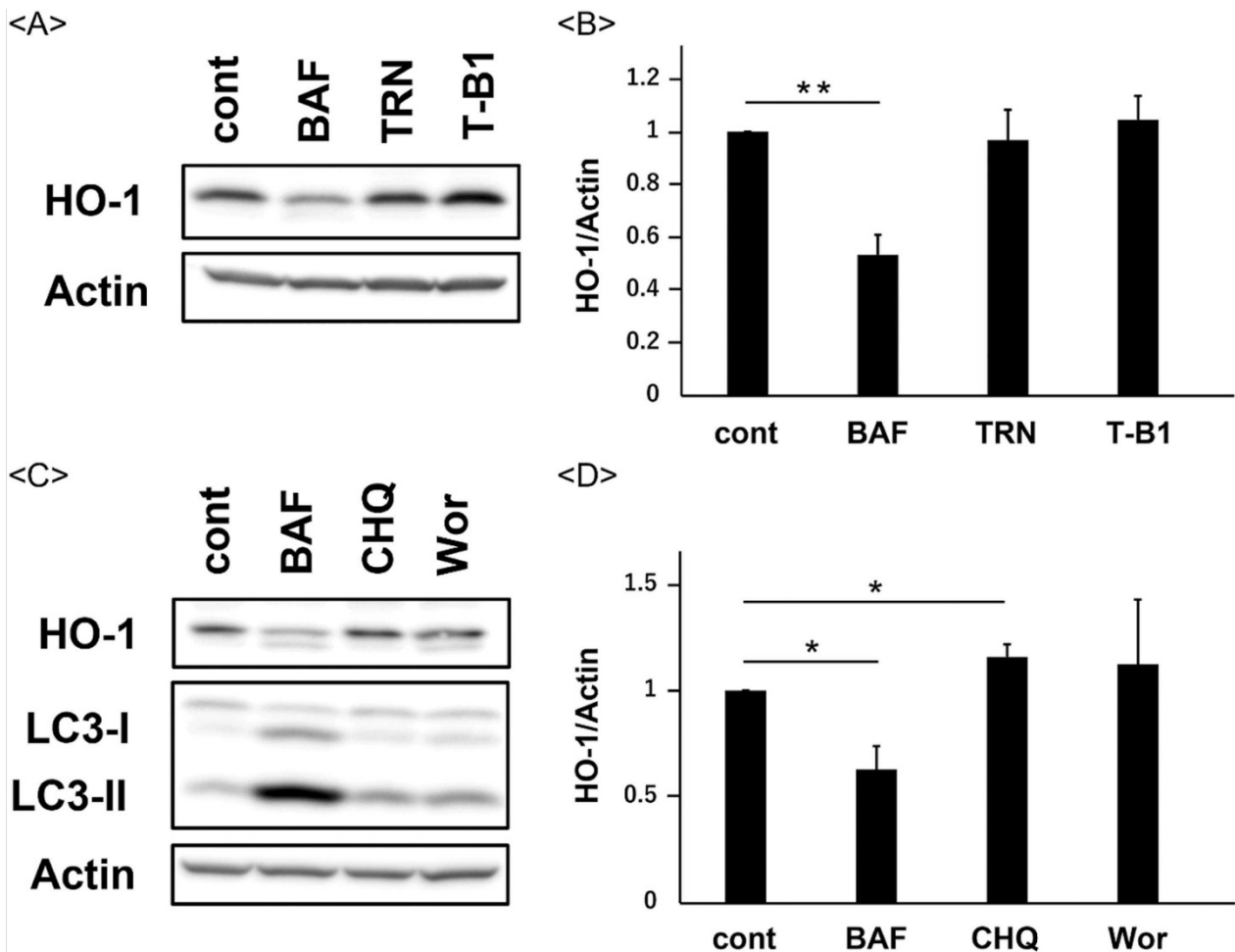


図19：絨毛細胞株におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるHO-1発現とオートファジーフラックス

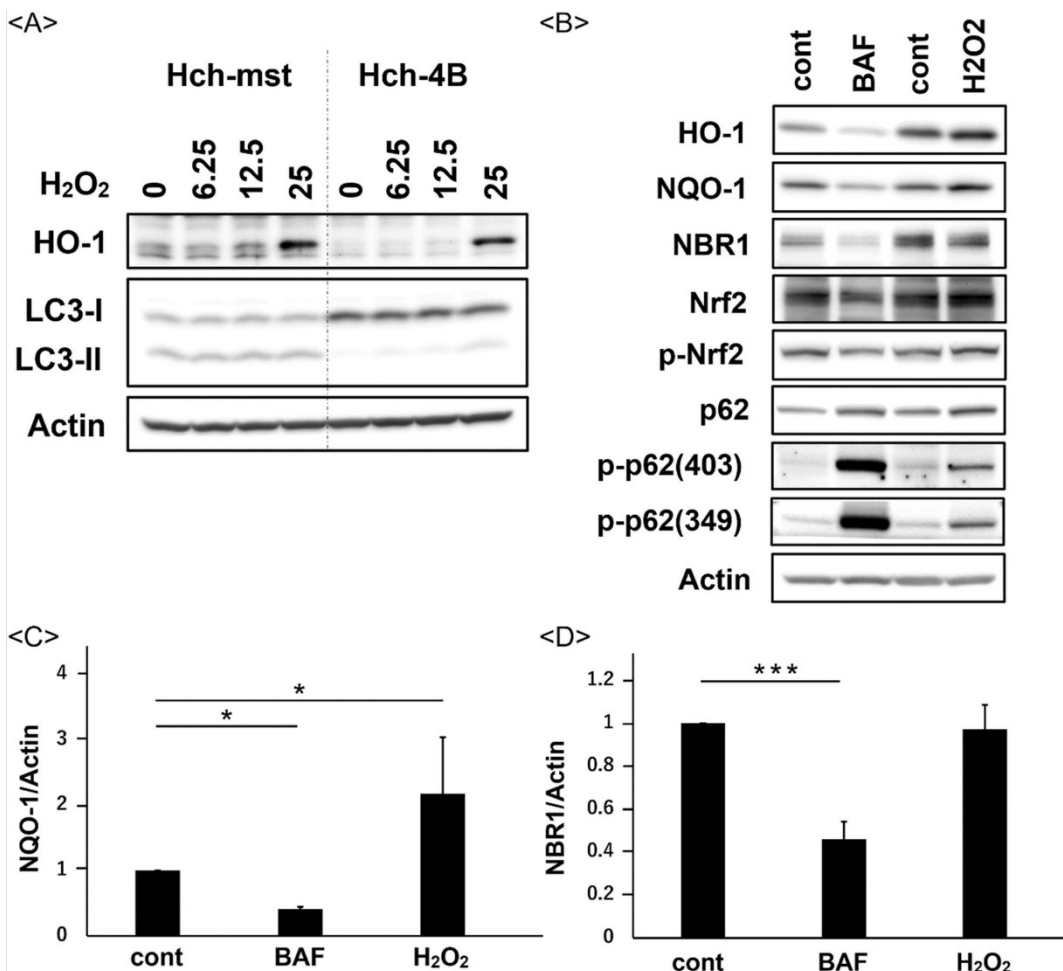
(A) BeWo細胞を様々な濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125~1000 μM) で24時間処理し、タンパク質回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF、20 nM) 処置した。(B) 1000 μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理したBeWo細胞におけるHO-1の発現量をアクチンで正規化したグラフ。(C) HchEpC1b-mSt細胞を、様々な濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3~25 μM) で24時間処理し、タンパク質回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF、20 nM) 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、タンパク質回収前2時間DMSOもしくはバフィロマイシンA1 (BAF、20 nM) 処置した。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20 : 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薬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)、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の発現量を評価した。(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.で表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。



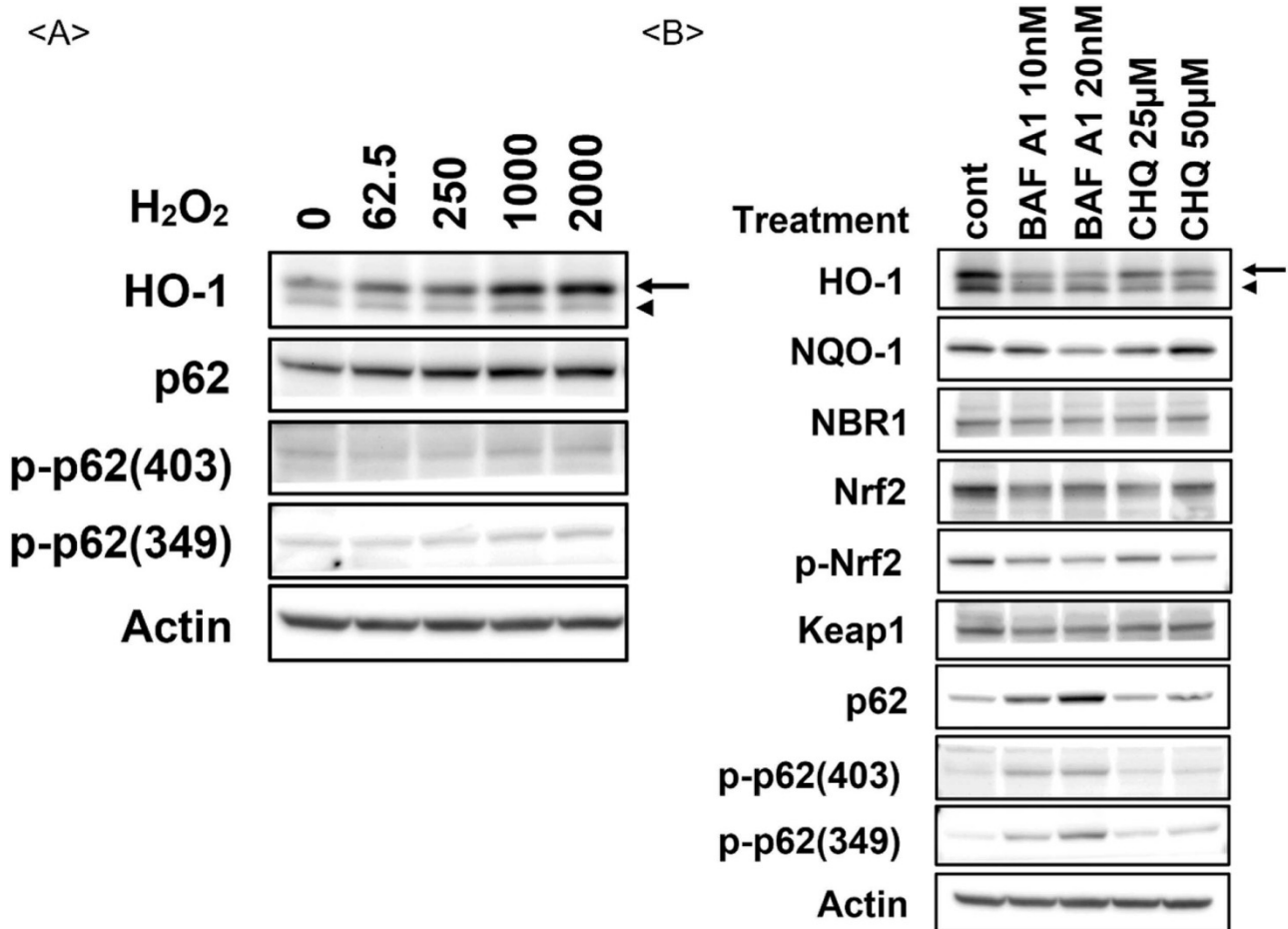


**図21 : バフィロマイシンA1によるHO-1の発現抑制は、NBR1の低下を伴う**

(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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1000 μM) で24時間処理 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。(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。\*\**P* < 0.01.



**図22：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タンパク質および選択的オートファジー関連タンパク質の発現**

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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62.5~2000 μM) で48時間処理した。ウェスタンブロットで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)、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。