

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01437

研究課題名(和文) ナノマテリアルのエピジェネティクス制御に着目したハザード発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of nanoparticle-induced biological effects focusing on epigenetic regulation

研究代表者

東阪 和馬 (Higashisaka, Kazuma)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：20646757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「ナノマテリアルによるエピジェネティック制御」の観点から、ナノマテリアルの物性-生体影響-エピジェネティック制御の連関解析を試みた。その結果、我々の生活に身近な物に使用されているナノ銀粒子が、ヒト肺胞上皮細胞株に対して、1) DNAメチル化率の低下、ならびに、DNAメチル化酵素であるDnmt1の蛋白質量の低下を誘導し、2) Dnmt1発現量の減少には、ユビキチン化の促進によるプロテアソーム分解が関与していることを明らかとした。今後、エピジェネティック制御を介した生体応答について追究することで、新たなハザードの同定と、その発現機序の解明に貢献できることを期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、エピジェネティック制御をも考慮に入れた、ナノマテリアルの安全性評価手法やハザード回避手法の開発へと展開できるものと期待される。また、ナノマテリアルによるハザード発現機構の解明は、有用かつ安全なナノ医薬品の開発支援に資する基盤情報を提供することで、創薬プロセスの効率化に直結し、我が国のナノ医薬品開発を大きく推進させる原動力となる。従って本研究は、ナノ安全科学研究とも言うべきものであり、安全な薬物治療による疾病克服を実現し、国民に健康で安全な社会を提供すると共に、ナノ医薬品産業の国際競争力の強化をもたらすと予想される。

研究成果の概要(英文)：In this research, based on the new viewpoint of "epigenetic control by nanomaterial", we tried to analyze the nanomaterial-induced biological responses by analyzing the relationship between physical property-biological responses-epigenetic control. As a result, silver nanoparticles, which are used for things familiar to our lives, 1) decreased DNA methylation rate for human alveolar epithelial cell lines, and reduced a protein amount of DNA methylation enzyme, Dnmt1. In addition, 2) the decrease in the amount of Dnmt1 was resulted from proteasomal degradation by promoting ubiquitination of Dnmt1. Investigating the biological responses through epigenetic control can contribute to the identification of new biological responses induced by nanomaterials and the elucidation of its mechanism.

研究分野：ナノ安全科学、毒性学

キーワード：DNAメチル化 ナノ銀粒子 プロテアソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノ酸化チタンやフラーレンといったナノマテリアル (NM) の開発と実用化が世界的に進展している。1次元が 100 nm 以下の素材である NM は、従来までのサブミクロンサイズ (数百 nm) 以上の素材と比較して、医薬品素材として様々な革新的機能を発揮する。従って、工学・薬学・医学分野において、21 世紀産業の根幹を担う素材として期待され、ナノ医薬品とも言うべき新たな治療への展開が図られている。

しかしながら、ナノ医薬品の根幹をなす NM の開発におけるボトルネックは、NM 特有の有用機能が、逆に、二面性を呈してしまい、我々の意図しない生体影響を誘発する可能性が指摘されていることである。言うまでも無く、NM の開発に向けては、有効性は当然ながら、いかにその安全性を確保するかが最大の焦点である。既に数多くの NM が実用化されつつあり、今後も、莫大な種類の新規 NM が様々な領域へ応用されることを鑑みると、安全かつ有効な NM の設計に向けては、NM 投与により誘発される生体影響 (ハザード) の評価と共に、そのハザード発現機序の解明、さらには、ハザードに対する予防法・解毒法の開発に資する科学的知見の集積が、国内外を問わず、医薬工学融合領域における緊急性と社会的ニーズの高い取組みと位置づけられている。

ゲノミクス技術の進歩に伴って、各種化学物質が遺伝子の発現を変化させることで、生体に対し様々な影響をおよぼすことが明らかとされているが、これら知見に加え、近年、化学物質などの環境因子がエピジェネティックな変化を誘導することで生体影響を示す可能性が報告されつつある。従って、NM 投与により誘発されるハザードに関するエピジェネティックな変化が明らかとされれば、そのエピジェネティックな変化を指標とすることで、NM の毒性/安全性の予測、さらには解毒法の確立につながり、安全かつ有効な NM の開発、ひいてはナノ医薬の開発に貢献できるものと期待される。一方で、世界的に見ても、NM 投与により誘発される生体影響に対し、エピジェネティックな観点からハザード発現機序の解明を試みた報告は殆どなく、さらには、NM が生体や細胞に対しエピジェネティックな影響を誘発するかどうかですら未だ情報が少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、化学物質曝露による毒性発現において重要な役割を果たすエピジェネティック修飾に焦点を当て、「ナノマテリアルによるエピジェネティック制御」という新たな観点のもと、物性-生体影響-エピジェネティック修飾の連関を解析することで、エピジェネティクスをも考慮に入れたナノマテリアルの安全性評価を試みた。

3. 研究の方法

ナノ銀粒子

表面がクエン酸修飾された、粒子径 10、50、100 nm のナノ銀粒子 (それぞれ nAg10、nAg50、nAg100) は nanoComposix (San Diego, CA, USA) より購入した。ナノ銀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。

培養細胞

ヒト肺胞上皮細胞 (A549 細胞) は American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) より購入した。A549 細胞の維持培養には、56°C、30 分間の非働化处理を行った 10% ウシ胎児血清 (GIBCO, Japan)、1% 抗生物質 (Gibco; CA, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle'

s Medium (D-MEM ; Wako Pure Chemical Industries, Ltd. ; Osaka, Japan) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。

ウェスタンブロットによる Dnmt 発現量への影響評価

6 ウェルプレートに細胞を播種し、DMEM で終濃度 10 μ g/mL に調製したナノ銀粒子、あるいは終濃度 10 μ M に調製した 5-aza-dC を 2 mL/well 加え、24 時間培養した。HaltTM Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) を添加した NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) で細胞を可溶化し、核内タンパク質を回収した。1 次抗体として Anti-Dnmt1, anti-Dnmt3a, anti-Dnmt3b (Abcam; Cambridge, UK)、anti-LaminA/C (Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA) を 0.4% BlockAce/PBST で希釈し、室温で 1 時間反応させた。2 次抗体として、HRP/anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)、あるいは、HRP/anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific) で処理し、発光像を LAS-4000 (FUJI Film, Tokyo, Japan) により撮影した。その後、ImageJ を用いて、得られたバンド強度を解析し、各試薬添加群のタンパク発現量の変化は、各サンプルのタンパク発現量を各サンプルの LaminA/C 量で除すことで解析した。

4. 研究成果

ナノ銀粒子によるメチル化 DNA への影響評価

本研究では、高い消臭・抗菌効果を有することから、衣類や消臭剤など生活に身近な物に使用されているナノ銀粒子を用いた。ナノ銀粒子含有製品には、主に、数 nm から数十 nm のサイズの粒子が利用されていることが報告されていることから、粒子径が 10、50、100 nm のナノ銀粒子 (それぞれ nAg10、nAg50、nAg100) を供した。まず、ナノ銀粒子が DNA メチル化に影響を与えるかを検討するため、ゲノム全体のメチル化 DNA の変化を評価した。DNA のメチル化部位は、シトシンの 5 位炭素であることが知られていることから、5-methyl cytosine (5mC) を指標にし、ナノ銀粒子の DNA メチル化への影響を評価した。nAg10、nAg50、nAg100 をヒト肺胞上皮細胞株である A549 細胞に曝露させ、免疫染色法を用いて 5mC を染色することで、24 時間後における核内の 5mC の蛍光強度を指標としてメチル化 DNA への影響を評価した。その結果、DNA メチル化酵素阻害剤であり、メチル化 DNA 減少のポジティブコントロールである 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を曝露させた群において、核の面積あたりの 5mC の蛍光強度の減弱が認められた。ナノ銀粒子では、nAg10、nAg50、nAg100 の全ての粒子において、対照群と蛍光強度に有意な減少が認められた。さらに nAg100 に比べ、nAg10、nAg50 曝露群において有意に蛍光強度が減弱すると共に、nAg10 において顕著な減弱が認められたことから (図 1)、粒子径が小さいほど、低メチル化を強く誘導することが示唆された。従って、ナノ銀粒子がメチル化 DNA を

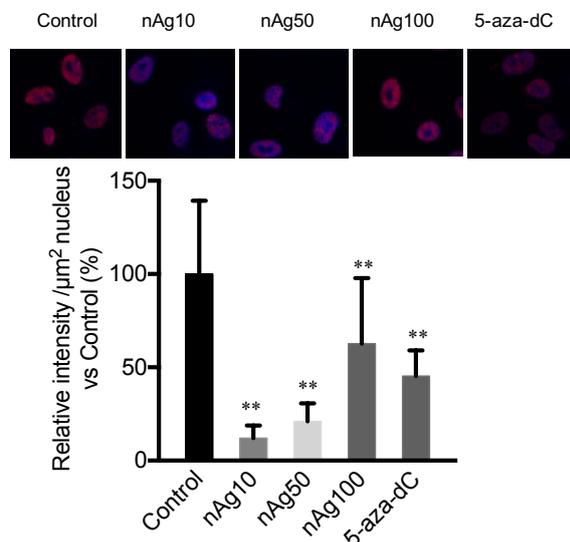


図1：ナノ銀粒子によるメチル化DNAへの影響評価

減少し得ることが明らかとなり、ナノ銀粒子の曝露によりエピジェネティック変異が誘導されることが示された。

次に、ナノ銀粒子が DNA メチル化を減少させる機序について検討するため、DNA メチル基転移酵素への影響について解析した。なお、ナノ銀粒子の粒子径が小さいほど、メチル化 DNA が顕著に減少することが明らかとなったことから、以降の検討では nAg10 に着目し、解析を進めた。DNA のメチル化は、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase : Dnmt) が担っており、Dnmt1、Dnmt3b といったサブタイプが存在する。Dnmt1 は、主に DNA 複製時のメチル基の維持に関与しており、Dnmt3b は、新規メチル基の付与を担っている。そこで、nAg10 曝露による、Dnmt1 のタンパク質発現量への影響について評価した。前述の検討と同様に、nAg10 を A549 細胞に曝露させ、

24 時間後に核内タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにより Dnmt1 のタンパク質発現量への影響を評価した。その結果、nAg10 の曝露によって Dnmt1 の発現量が有意に減少することが示された (図 2a)。また、Dnmt3b の発現量が nAg10 曝露により有意に増加することが認められた (図 2b)。さらに、nAg10 による Dnmt1 の減少の濃度依存性についても検討を行ったところ、低濃度においても Dnmt1 のタンパク質発現量が減少することが認められた (図 2c)。nAg10 の曝露により、メチル化 DNA および Dnmt1 の減少が認められたことから、nAg10 による DNA メチル化率の減少には、Dnmt1 の減少が関与していることが示唆された。以上の結果より、メチル基転移酵素のうち、nAg10 によるメチル化 DNA の減少に関与しているのは Dnmt1 であると考えられたため、以降の検討では Dnmt1 の発現減少に着目し、nAg10 の作用機序について検討を行うこととした。

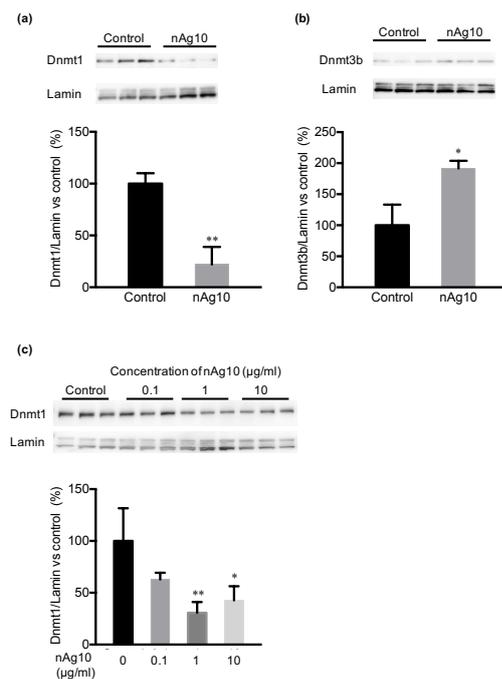


図2: ナノ銀粒子によるDNAメチル化酵素の発現におよぼす影響評価

ナノ銀粒子による Dnmt1 発現減少機序の解明

Dnmt1 の蛋白質分解機構として報告されているプロテアソーム経路に着目し、ナノ銀粒子がプロテアソーム経路におよぼす影響を評価した。プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを A549 細胞に添加し、6 時間培養してプロテアソームが阻害されている状態を誘導した。培養後、阻害剤を含んだ培養液を除去し、nAg10 及び、5-aza-dC を加え、さらに 24 時間培養し、核内タンパク質を抽出した。抽出した核内タンパク質を用い、Dnmt1 のタンパク質発現量をウェスタンブロット法により評価した。その結果、nAg10 曝露群において、プロテアソームの阻害によって Dnmt1 の発現量の回復が認められ (図 3a)、nAg10 による Dnmt1 の発現量の減少には、プロテアソーム経路が関与していることが示唆された。さらに、プロテアソーム誘導因子におよぼす影響を追究することで、ナノ銀粒子曝露による低メチル化の誘導機序の解明を試みた。まず、ナノ銀粒子曝露による低メチル化にプロテアソーム分解が関与しているかどうかを、プロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを共処置することで確認した。その結果、ナノ銀粒子曝露により誘導された DNA メチル化率の低下が、ラクタシスチンとの共処置で回復すること

が確認でき (図 3b)、Dnmt1 の減少のみならず、ナノ銀粒子曝露による低メチル化にもプロテアソーム分解が寄与していることが示唆された。そこで、ナノ銀粒子曝露がプロテアソーム誘導の目印となるユビキチン修飾へおよぼす影響を評価したところ、nAg10 を曝露することで、Dnmt1 におけるユビキチン量が増加することが示された (図 3c)。従って、nAg10 曝露による Dnmt1 発現量の減少には、ユビキチン化の促進によるプロテアソーム分解が関与していることが示唆された。今後は、DNA の脱メチル化部位を特定することで、ナノ銀粒子曝露によるエピジェネティック変異を介した生体影響について検討し、新たなハザードの同定のみならず、ハザード発現機序の解明に貢献できることを期待している。

本研究結果は、ハザード情報と脱メチル化部位の関連解析による、エピジェネティック変異を介したハザードの特定のみならず、ハザードの発現を防ぐための情報の収集に貢献できることが期待される。将来的には、本研究で得られたナノ粒子によるエピジェネティック変異に関する情報を基盤として、より安全性の確保や社会における使用範囲の拡大による豊かな社会の実現のみならず、エピジェネティック変異誘導の詳細な機序解明にも貢献できることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Uemura E., Yoshioka Y., Hirai T., Handa T., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Relationship between size and surface modification of silica particles and enhancement and suppression of inflammatory cytokine production by lipopolysaccharide or peptidoglycan stimulated RAW264.7 macrophages., J. Nanopart. Res., 査読有, 18: 165, 2016. doi: 10.1007/s11051-016-3475-1

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. 佐藤建太, 東阪和馬, 衛藤舜一, 越田 葵, 小椋万生, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカが精巢に及ぼす、エピジェネティックな変異を介したハザード同定., 日本薬学会第 139 年会., 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2019 年 3 月 21-23 日.
2. 東阪和馬, 長野一也, 松本博志, 堤 康央: 食品関連製品に含まれるナノ素材の安全性評価～ナノ安全科学研究からナノ最適デザイン研究へ～ (シンポジウム: ナノ化学物質の安全性評価と展望)., 第 34 回日本毒性病理学会., 沖縄かりゆしアーバンリゾート・ナハ (沖縄県那覇市), 2018 年 1 月 25-26 日.

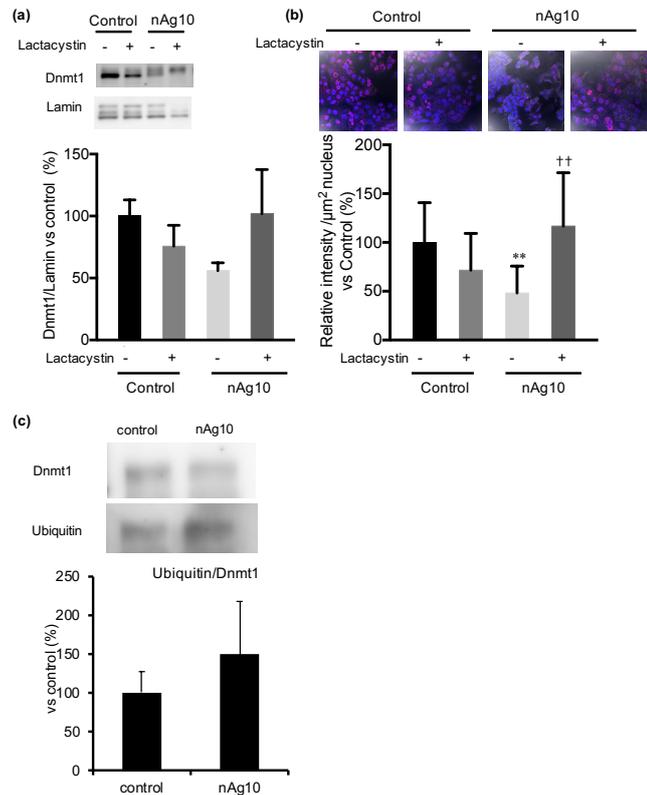


図3: ナノ銀粒子によるDnmt1発現減少機序の解明

3. 東阪和馬, 真木彩花, 青山道彦, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 吉岡靖雄, 長野一也, 堤 康央: ナノ銀粒子曝露が DNA メチル化へおよぼす影響解析., 第 44 回日本毒性学会学術年会., パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2017 年 7 月 10-12 日.
4. 真木彩花, 東阪和馬, 青山道彦, 西川雄樹, 石坂拓也, 笠原淳平, 長野一也, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ銀粒子曝露による DNA メチル化酵素への影響., 第 43 回日本毒性学会学術年会., ウィンクあいち (愛知県名古屋市), 2016 年 6 月 29 日-7 月 1 日.

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 真木 彩花、林 穎、佐藤 建太

ローマ字氏名: Ayaka Maki, Ying Lin, Kenta Sato

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。