

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15856

研究課題名(和文) 銀ナノ粒子によるオートファジー阻害と細胞毒性の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of autophagy inhibition and cytotoxicity by silver nanoparticles

研究代表者

宮山 貴光 (MIYAYAMA, TAKAMITSU)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20620397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：銀ナノ粒子は、抗がん剤や抗病原微生物薬など医療応用への開発が最も期待されている金属ナノ粒子である。一方、細胞毒性も強い為、生体内挙動と毒性発現機構を明らかにする試みがなされている。A549細胞を用いて銀ナノ粒子を曝露したところ、リソソームに分布・蓄積し、内腔のpHを上昇させて機能破綻を引き起こした。ここでオートファジー・リソソーム系を評価したところ、p62/SQSTM1とLC3B-11はいずれも上昇し、TFEBは減少した。銀ナノ粒子は、リソソームpH上昇とTFEBの減少を同時に引き起こして毒性に寄与するもののリソソームpH上昇による機能破綻が細胞毒性の主要なターゲットであると判断できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺を構成するあらゆる細胞種において、銀ナノ粒子の応答は共通に保存されていたことから、確かな学術的証明を得た。一方で、銀ナノ粒子の毒性はTFEBの遺伝子発現調節のみでは解決できない新しい学術的問いを見出すこととなった。このことは、銀ナノ粒子の科学的エビデンスに基づいた創薬開発が、より一層波及すると期待される。また、他の金属ナノ粒子の創薬開発にも応用できるので、将来的に抗がん剤や抗病原微生物薬などの治療を受ける患者が恩恵を受けるのみならず、開発製造に関わる研究者や技術者へのナノ粒子曝露に対する健康リスクを確保することにもつながり、衛生学分野において学術的なインパクトが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although silver nanoparticles (AgNPs) are widely expected in nano medicine, the mechanism by which AgNPs cause pulmonary damage is unclear. In cells exposed to citrate-coated 60-nm AgNPs, confocal laser microscopic examination showed a decrease in the LysoTracker fluorescence signal and an increase in that of Cyto-ID, indicating lysosomal pH alkalization and autophagosome formation, respectively. The proteins p62 and microtubule-associated protein light chain 3B-11 (LC3B-11) are both degraded by autophagy, and their levels increased depending on AgNP dose. Furthermore, AgNP-induced increase in LC3B-11 was not enhanced by treatment with the autophagic inhibitor bafilomycin A1. TFEB mRNA levels, and protein levels in cytosolic and nuclear fractions, were suppressed by exposure to AgNPs, suggesting transcriptional inhibition of TFEB expression. The present study suggests that AgNP-induced lysosomal dysfunction plays a principal role in the autophagic flux defect.

研究分野：分子細胞毒性学

キーワード：銀ナノ粒子 オートファジー リソソーム 肺がん細胞 初代培養細胞 肺気道上皮細胞 肺胞上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は、細胞死を誘導することから (AshaRani, P. V., et al. *ACS Nano*, 2009) がん治療や抗病原微生物薬などを目的としたナノドラッグの創薬開発が期待されている。すでに、金属素材や有機素材を基盤にした種々のナノ粒子が開発されているが、その中でも銀ナノ粒子は抗菌性も併せ持つという唯一の特色を有している。このことは、他のナノ粒子と比較して生体への病原微生物感染のリスクを軽減できるという利点があり、二次感染防止など臨床応用への期待が最も高い。すでに、経済協力開発機構 (OECD) において、医療応用を含めた安全使用の実現を目的に、加盟先進国が積極的に研究開発を推進すべきナノ粒子のひとつとして、銀ナノ粒子を定めている。個体レベルにおいて、銀ナノ粒子は生体内に取り込まれると臓器や組織に幅広く分布し、一定の曝露量にさらされると臓器の機能障害や機能不全が引き起こされる。また、細胞レベルにおいて、銀ナノ粒子はリソソームに蓄積するが一定の曝露量にさらされると細胞死を誘導することが指摘されている。しかしながら、これらについて詳細な分子機構は明らかにされていない。

近年、オートファジーが、プログラム細胞死であるアポトーシスを制御する機能を担っていることが報告された (Honda, S., et al., *Nature Communications*, 2014.)。オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを分解する過程であり、オートファゴソームに隔離されたタンパク質は、オートファジーの標的タンパク質として、リソソームとオートファゴソームの融合によって生じるオートリソソーム内部で最終的にアミノ酸に分解される。ここで、オートファジーの過程が何らかの理由により誘導あるいは阻害されると、アポトーシスが誘導されることが知られている。オートファジーの最終段階である分解過程は、リソソームの融合が必須の条件となっている。リソソームの融合が行われないとオートファジーの分解過程は進行しない。その結果、分解を受けるはずの標的タンパク質は蓄積し、最終的に細胞死が誘導される。また、逆に、オートファジーが積極的に進行する過程で細胞死が誘導されることも報告されている。これらの過程に、銀ナノ粒子が関与するかは明らかにされていない。

銀ナノ粒子がリソソームに蓄積することと、プログラム細胞死を制御するオートファジーの過程にリソソームとオートファゴソームの融合が必須であることは確かである。リソソームの pH が変化するとオートファジーの進行に影響を与えることや、リソソームとオートファゴソームの融合を担うタンパク質の機能が失われると、オートファジーの進行に影響を与えることが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、オートファジーに着目して、銀ナノ粒子と細胞毒性誘導の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。これまでの銀ナノ粒子の毒性研究において、リソソーム pH の変化とオートファジーの影響を関連させた細胞毒性の報告例はなく、全く新規の研究計画を提案した。特に、銀ナノ粒子の毒性を調べる上で、リソソームの pH を制御する因子に対して阻害剤を用いる試みや、リソソーム融合に関わる因子を遺伝子改変する試みは、過去の実験報告においても例はなかった。本研究における銀ナノ粒子とオートファジーに関連性を示し、毒性メカニズムを解明することで、銀ナノ粒子の科学的エビデンスに基づいた創薬開発を、より一層波及させる。

3. 研究の方法

本研究は、第 1 に、リソソーム pH を調節する H⁺ 輸送体を阻害し、オートファジーの影響を評価した。第 2 に、リソソーム融合を担う遺伝子を遺伝子改変で調節し、オートファジーの阻害を評価した。最後に、上記の第 1 と第 2 の細胞実験条件で、銀ナノ粒子を併用処理して細胞毒性を評価した。オートファジー評価に、western blotting を用いた蓄積タンパク質の定量と、共焦点レーザー顕微鏡・走査型電子顕微鏡を用いたリソソームとオートファゴソームの観察を行った。また、細胞死の誘導評価は、改変型 MTT アッセイにて定量評価した。上記の実験は、ヒト肺胞上皮がん細胞 A549、ヒト初代培養肺胞上皮細胞 HPSAEpiC、ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B をそれぞれ用いた。

4. 研究成果

研究実施計画に従い、リソソーム H⁺ 輸送体の阻害実験を行った。リソソームの pH 維持に最も寄与が大きいと想定されている H⁺ 輸送体 V-ATPase に着目した。ヒト肺胞上皮がん細胞 A549 を用いて、銀ナノ粒子と V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A1 をそれぞれ曝露した後、リソソームの pH 変化を共焦点レーザー顕微鏡によるライブセルイメージングによって評価した。ここでは、酸性オルガネラ下で蛍光を発する on-target 型の蛍光プローブを用いた。

その結果、銀ナノ粒子は、リソソームに分布・蓄積した。また、バフィロマイシン A1 と同様にリソソーム pH を上昇させて機能破綻を引き起こしたことから、毒性に關与する可能性が示唆された。銀ナノ粒子のリソソーム pH 上昇が、オートファジー・リソソーム系に影響すると仮定し、オートファジーを評価した。オートファジーのマーカーとして知られる p62/SQSTM1 と LC3B-II を western blotting で評価したところ、いずれのタンパク質発現量も銀ナノ粒子曝露により上昇した。詳細な解析のために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オートファゴソームを特異的に蛍光標識するプローブでオートファジーを評価したところ、蛍光が上昇したため、オートファゴソームからオートリソソームへの移行が行われていないことも確かめられた。この現象は、オートファジーの阻害や誘導によっても同様に観察されることが国内外の学術誌や学会で報告されていたため、flux assay を用いて、検討したところ、銀ナノ粒子は、オートファジーを阻害することが明らかとなった。すなわち、銀ナノ粒子は、リソソームをターゲットにして、機能破綻を引き起こし、結果、オートファジー・リソソーム系のオートファゴソームからオートリソソームへの移行が行われず、毒性に至ると考えられた。この実験的事実をさらに詳細に検討するため、オートファジー・リソソーム系のマスターレギュレーターであり、オートリソソームを形成するために必須の因子として知られている転写因子 transcription factor EB (TFEB) に着目して実験を行った。A549 細胞の TFEB の発現量は、銀ナノ粒子の曝露濃度依存的に減少することが分かった。細胞内画分における TFEB の定量を行ったところ、細胞質と核において共に TFEB タンパク質量が減少していた。この結果から、銀ナノ粒子が、オートファジー・リソソーム系の最上流である TFEB を減少させる結果、毒性に寄与するものと想定された。しかしながら、TFEB の減少を遺伝子改変操作で意図的に増大させ、銀ナノ粒子によって減少した TFEB タンパク質を補う実験を行ったところ、オートファジー阻害の改善や A549 細胞の毒性軽減には十分な効果を得られなかった。このことは、銀ナノ粒子が、リソソーム pH 上昇と TFEB の減少を同時に引き起こして毒性に寄与するものの、リソソーム pH 上昇による機能破綻が細胞毒性の主要なターゲットであると判断できた。

銀ナノ粒子と肺胞上皮がん細胞 A549 の研究成果から、銀ナノ粒子はリソソームの pH 上昇による機能破綻と TFEB の減少を誘導することが分かった。この成果を基に、ヒト由来の他の肺細胞種においても銀ナノ粒子の毒性を検証した。ここでは、ヒト初代培養肺胞上皮細胞 HPSAEpiC とヒト気道上皮細胞 BEAS-2B を用いた。銀ナノ粒子を曝露したところ、用量依存的にいずれの細胞も毒性が増大した。A549 細胞の毒性と比較すると、HPSAEpiC 細胞と BEAS-2B 細胞の方が、より顕著に毒性を生じることでも分かった。次に、各細胞種のオートファジー応答を調べるため、銀ナノ粒子曝露後の、p62/SQSTM1 と LC3B-II のタンパク質発現量を western blotting で評価したところ、いずれも銀ナノ粒子曝露濃度依存的に増大した。詳細な解析のために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オートファゴソームを特異的に蛍光標識するプローブでオートファジーを評価したところ、蛍光が上昇したため、オートファゴソームからオートリソソームへの移行が阻害されていることも確かめられた。すなわち、ヒト肺胞上皮がん細胞 A549 で観察されていた銀ナノ粒子による細胞応答は、初代培養肺胞上皮細胞 HPSAEpiC や不死化された肺気道上皮細胞 BEAS-2B においても共通に観察された。その一方で、オートファジー応答と細胞毒性は相関するものの、銀ナノ粒子曝露量に対する細胞種ごとの感受性は異なり、特に、がん細胞と正常細胞において明確に違いがみられた。以上のことから、本研究で明らかになった銀ナノ粒子とオートファジーの応答メカニズムは、肺を構成するあらゆる細胞種において共通に保存されているという確かな学術的証明を得られたとともに、TFEB の遺伝子改変による調節では毒性が改善できない理由はなぜなのかという新しい学術的問いを見出すこととなった。このことは、がん細胞と正常細胞における銀ナノ粒子の毒性に対する感受性が異なる理由にも関連するものと想定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyayama Takamitsu, Fujiki Kota, Matsuoka Masato	4. 巻 46
2. 論文標題 Silver nanoparticles induce lysosomal-autophagic defects and decreased expression of transcription factor EB in A549 human lung adenocarcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 148 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tiv.2017.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松岡 雅人、蔣池 勇太、藤木 恒太、宮山 貴光	4. 巻 40
2. 論文標題 化学物質の毒性発現機構 -最近のシグナル伝達研究から-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 産業医学ジャーナル	6. 最初と最後の頁 61 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kota Fujiki, Hisako Inamura, Takamitsu Miyayama, Masato Matsuoka	4. 巻 292
2. 論文標題 Involvement of Notch1 signaling in malignant progression of A549 cells subjected to prolonged cadmium exposure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7942 ~ 7953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.759134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮山貴光、藤木恒太、松岡雅人
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮腺がん細胞A549を用いた銀ナノ粒子のオートファジー・リソソーム系阻害とTFEB制御遺伝子の減少
3. 学会等名 フォーラム2019・衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamitsu Miyayama, Kota Fujiki, Masato Matsuoka
2. 発表標題 The role of lysosomal dysfunction and autophagic defects in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 Asiattox2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮山 貴光、藤木恒太、松岡 雅人
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮腺がん細胞を用いた銀ナノ粒子によるオートファジー阻害とTFEBの減少
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮山 貴光、藤木恒太、松岡 雅人
2. 発表標題 ヒト肺細胞における銀ナノ粒子のオートファジー・リソソーム系阻害とTFEBの減少
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research map https://researchmap.jp/takamitsu-miyayama 東京女子医科大学研究業績データベース https://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ybygygdggk
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	藤木 恒太 (FUJIKI Kota) (80632504)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	
連携研究者	松岡 雅人 (MATSUOKA Masato) (50209516)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	