

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21590670

研究課題名（和文）カーボンナノチューブ暴露により胸膜中皮及び肺胞上皮細胞が被る
遺伝子損傷の評価研究課題名（英文）DNA damage in human pleural mesothelial cells and lung epithelial
cells induced by exposure to carbon nanotubes

研究代表者

小笠原裕樹（OGASAWARA YUKI）

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20231219

研究成果の概要（和文）：カーボンナノチューブの生体影響を、ヒト由来胸膜中皮細胞を用いて評価した。本研究では、癌化が懸念される標的組織であるヒト胸膜中皮に由来する細胞である MeT-5A に対し、高度に精製された CNT を曝露することで、その細胞毒性について調べ、次いでコメットアッセイにより遺伝毒性の評価を行った。また、核内に蓄積する 8-OHdG 量の変化を定量すると共に、新たな試みとして、酸化 DNA 除去修復酵素の発現変動についても解析することで、CNT 曝露による酸化的 DNA 損傷の可能性について検証した。その結果、高純度の単層及び多層カーボンナノチューブの曝露では、8-OHdG の蓄積やカルボニルタンパク質の生成といったような、酸化的な細胞障害は観察されなかった。しかし、高純度の CNT を用いた場合にも、有意な細胞増殖の抑制と変異原性が認められたことから、誘発される胸膜中皮細胞の DNA 損傷は、ゲノム DNA あるいはヌクレオチドプールの単純な酸化によってのみ起こるものではないことが示唆された。今後、アスベストとは異なる機序によるカーボンナノチューブによる DNA 損傷作用の機序について更なる解析が望まれる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the potential risk of single-walled carbon nanotube (SWCNT) and multi-walled carbon nanotube (MWCNT) exposure in human pleural mesothelial cells. CNT cytotoxicity was determined using a trypan blue exclusion assay, and DNA damage was detected using an alkaline comet assay. The concentration of 8-oxodeoxyguanosine (8-OHdG) in DNA was measured using HPLC with electrochemical detection. The expression of base excision repair enzymes in the cell was estimated by immunoblot analysis. We observed inhibitory effects on cell proliferation and induction of DNA damage following exposure of cells to purified CNTs that were suspended in dispersion medium. However, accumulation of 8-OHdG in DNA was not found. In addition, the expression levels of base excision enzymes that are involved in hOGG1, hMTH1 and MYH in MeT-5A cells remained unchanged for 24 h after carbon nanotube exposure. CNTs significantly inhibit cell proliferation and decrease DNA damage in human pleural mesothelial cells. Our results indicate that the mechanism of CNT-induced genotoxicity is different from that of exposure to reactive oxygen species, which causes oxidative DNA modifications and 8-OHdG production. Further investigation is required to characterize the specific DNA mutations following CNT exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学

キーワード：カーボンナノチューブ,酸化ストレス

胸膜中皮細胞, DNA 損傷修復, コメットアッセイ

1. 研究開始当初の背景

産業界においてナノマテリアルは夢の化学物質として期待され、開発が盛んに行われると共に、一部は既に使用されていた。ナノテクノロジーは、非常に注目を集めている科学技術であり、エレクトロニクス、医療応用を始めとして、人類に非常に大きな貢献をもたらすものと期待されている。ナノ材料には既に製品化されているものも多く、2015年において全世界で1兆ドルといわれるなど、今後、市場の拡大が予測される。その一方で、そのリスクの存在が懸念されており、リスクを最小に抑えながらその発展を図ろうとするいわゆる「責任あるナノテクノロジーの展開」は、世界的なコンセンサスとなっている。しかしナノ粒子の有害性については、現時点において、研究の蓄積が少なく、国際的なコンセンサスは未だ形成されていない状態である。即ち、その安全性は担保されておらず、生体影響を懸念する声も多い状況にあった。特にアスベストとの類似性が指摘されるカーボンナノチューブ (CNT) について、その発ガン性の有無を明確にすることが、焦眉の急を要するものであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、アスベストとの比較も含め、単層及び多層 CNT の生体影響に注目した。いまだ不明瞭であるナノ粒子の毒性評価の一環として、CNT が胸膜中皮細胞に取り込まれるとき、酸化的な DNA の損傷が観られるのか否か、また、どのような遺伝子変動が起こり、それが毒性発現に繋がるのかという点を明らかにすることを目的とする。まず中皮細胞あるいは肺胞上皮細胞に起こる酸化的損傷を詳細に解析する。次いで CNT 暴露による遺伝子の発現変動を解析し、更にその遺伝子の mRNA 量の変化をリアルタイム PCR 法により

経時的に調べると共に、発現するタンパク質を解析し、中皮細胞が悪性細胞腫となる可能性を、その初期的かつ微細な変化から類推すべく、検討を試みる。また、それに先立って、CNT の暴露実験により、新しい試みとして、取り込まれたナノ粒子のみならず、中皮細胞内での活性酸素あるいは NO の発生を観察する。また、ヒト胸膜中皮由来樹立細胞 (Met-5A)、肺胞上皮由来細胞株、更に正常細胞をも視野に入れて暴露を行い、CNT による毒性発現のメカニズムを解析することで、「責任あるナノテクノロジーの展開」の一助とすることを目標とする。動物実験で投与方法やその量的問題が討議される中、本研究は細胞レベルでの評価に徹し、CNT の取り込みのメカニズムと、細胞応答(主に酸化ストレス)を肺胸膜中皮と肺胞上皮で詳細に解析し、その状態を把握した上で、生じる酸化生成物を見極める。発症までに30年余を要するという腫瘍の微細な変化を見出すべく、DNA 損傷に焦点を当て、現在知られる方法だけでなく、新たな検出法として、細胞内腫瘍マーカーともいえる、3種の修復酵素の発現変動と、従来殆ど解析されていない変異に発展する可能性のある DNA-付加体の検出についても試みる。

3. 研究の方法

(1)使用するクリソタイル及びCNTに混入する遷移金属の洗浄、除去を徹底して行った。また、取り込みに関わる肺胞サーファクタント成分によるコーティングの条件などを検討した。

(2)ヒト由来肺胞上皮及び胸膜中皮細胞を用いて、アスベストであるクロシドライト、クリソタイル、単層及び多層 CNT、更には酸化チタンなどのナノ粒子を分散後、曝露して一定時間培養した。具体的には、ヒト胸膜中

皮由来細胞 MeT-5A あるいはヒト肺胞上皮 A549 細胞を 10%FBS 含有 M199 培地あるいは MEM 培地で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。1 × 10⁴ cells/cm² となるように播種し 4-5 日間あるいは 2-3 日間培養して 1 × 10⁵ cells/cm² になる前に継代した。

本研究において、SWCNT は L-Purified Single-wall Nanotube (long) (SES Research, Outer diameter < 2nm, Length 5-15μm, Ash content: < 2%)、MWCNT は L-Purified Multi-Wall Nanotube (long) (SES Research, Outer diameter 10-30nm, Length 5-15μm, Ash content: < 0.2%) を用いた。

CNT の分散に用いた擬似肺胞内液 [5.5mM D-glucose、0.6mg/mL BSA、0.01mg/mL dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC)] は、Porter らの方法に従って調製した。DPPC は使用時に、DPPC を加え、室温下にて発振子型超音波処理することで懸濁し、擬似肺胞内液を均一な懸濁液状態とした。SWCNT 及び MWCNT の分散は、ガラス試験管に CNT を精量し、1mg/mL となるように PBS を加えて懸濁させる。水浴型超音波発生器中で音波処理した後、よく攪拌する操作を 3 回繰り返す、その懸濁液を遠心分離した。その上清を除去し、1mg CNT/mL となるように用時調製した擬似肺胞内液を添加して混和した後、ポリスチレン製チューブに移し、発振子型超音波発生器を用いて室温下で処理を行ない均一な懸濁液とした。

MeT-5A 細胞あるいは A549 細胞を 2 × 10⁴ cells/cm² となるように播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後、分散させた CNT 懸濁液を添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一定時間培養した。その後、培養培地を吸引除去し、PBS で洗浄後、細胞を剥がして集めた。細胞毒性の実験では、5mL 培養液を用い、約 5 × 10⁵ cells の MeT-5A を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養し、細胞を接着させた。その培地中 20μg/mL (4μg/cm²) 及び 100 μg/mL (20μg/cm²) の CNT を添加し、0、24、48、72 時間後にトリプシン処理により剥がした細胞を培養培地に懸濁後、0.4% トリプンブルー溶液と混和して死細胞を染色し、生細胞数を計測した。

DNA 損傷作用(変異原性)はコメットアッセイ法により測定を行った。

コメット像の解析には蛍光顕微鏡付属のデジタルカメラと制御ソフトを用い、その Tail length をマニュアルに従って計測した。各実験から得られた画像からランダムに選択した 100 個ずつのコメット像について測定し、3 回の独立した実験から得た合計 300 個のコメット像から平均値を求めた。

DNA 損傷修復酵素の発現変動は、以下の方法により測定した。調製した細胞分画液を SDS-PAGE (12.5% ゲル) で展開後、ゲルから

タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、PVDF 膜をブロッキング剤で処理し、洗浄後、抗体希釈液で希釈した各酵素に対する一次抗体を用いて反応を行った。洗浄後、PVDF 膜と抗体希釈液で希釈した二次抗体と反応させた。PVDF 膜を洗浄後、化学発光試薬を用いて各酵素を検出した。

8-OHdG の測定は、Kim らの方法に準じて行った。8-OHdG 及び dG は、逆相カラムを用いて分離後、電気化学検出機と紫外可視検出機によりそれぞれ検出した。8-OHdG 及び dG 標準液より得られたピーク面積から、実試料中の 8-OHdG 及び dG 量を求めた。

有意差検定は Excel、2007 (Ver. 12.0 Microsoft) を用い、2 群間の比較は対応のない *t* 検定法により行い、3 群間の比較では Bonferroni 法により検定を行った。いずれの場合も危険率 5%未満 (*p* < 0.05) の場合を有意差有と判定した。

(3) アスベストを曝露した肺胞上皮細胞 A549 については、グルタチオン濃度の変化、各種酵素の活性変動及びカルボニルタンパク質の検出を試みた。酸化チタンナノ粒子及び非晶系ナノシリカを暴露した胸膜中皮細胞 MeT-5A を試料として、8-OHdG の測定、DNA 損傷修復酵素の発現変動、コメットアッセイによる変異原性及び細胞内活性酸素種の発生について解析を行い、その遺伝毒性と DNA 損傷作用の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 発癌性が強い事が知られるクロシドライトと、白石綿として知られるクリソタイルを用いて、ヒト肺胞上皮由来細胞株 A549 に対するより曝露により誘導される酸化ストレスについて評価した。クロシドライト及びクリソタイルを曝露したとき、低分子 SH 基の減少と、膜脂質の酸化二次産物であるアルデヒドの生成が認められた。更に、そのアルデヒドがタンパク質と反応して生成すると考えられるカルボニル化タンパク質が観察された。一方、そのカルボニル化に伴いグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性の著しい低下が起り、本酵素が活性部位に Lys 残基を有する事から、生成するカルボニルタンパク質が (G6PDH) であることを予想し、免疫沈降法とイムノブロット法を用いて詳細な解析を行った。その結果、タンパク質のリジン残基と反応して生成すると考えられる一つのカルボニル化タンパク質を見出し、そのカルボニル化し易いタンパク質が G6PDH であることを証明し、カルボニル化 G6PDH が、アスベスト曝露の新たなバイオマーカーの一つとなる可能性が示唆された。

(2) CNT の分散法を検討した結果、擬似肺胞液を用いて、2 段階の超音波処理を行う事で、少なくとも 24 時間以内は沈殿を生じ

ることのない CNT 懸濁液を得ることが出来た。その懸濁液を用いて、MeT-5A に対して SWCNT 及び MWCNT を曝露し、各々の細胞毒性をトリパンブルー排除能の変化を観ることにより評価した。SWCNT 及び MWCNT を終濃度 20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) となるように培養培地中に添加し、3 日間培養した。その結果、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の曝露では SWCNT、MWCNT ともに MeT-5A の増殖を顕著に阻害し、死細胞数も増加した。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件においても 48 時間以降で、SWCNT 及び MWCNT 曝露による細胞増殖の有意な低下が観察されたが、その程度は小さく、72 時間培養後における阻害率は、Control 群に比べ 30%程度であった。

DNA 損傷に伴う修復の過程で、DNA の切断が起こる事から、過酸化水素を添加した場合には、未処理の場合に比べ明瞭なコメット Tail (ほどけた DNA 鎖) が確認された。また、MWCNT を曝露した細胞のコメット像において、細胞核上に、多くの影が観察された。

本実験では、このコメット Tail の長さから DNA 損傷作用を評価した。コメットアッセイの結果、曝露 8 時間及び 24 時間後において MeT-5A の DNA が損傷、修復を受けている事が明らかとなった。

この実験において、SWCNT を 8 時間曝露した群では有意差は認められなかったが、24 時間の曝露では約 3 倍の長さのコメット Tail が観察された。また、MWCNT 群では曝露 8、24 時間後において、いずれも有意な DNA 損傷が観察され、24 時間後の損傷の程度はコントロール群の約 2.5 倍であった。

次に、CNT 曝露後の MeT-5A に対し、酸化損傷のマーカーである細胞内 8-OHdG 量の変動を調べた。具体的には、同一サンプル中の dG を UV 検出器により定量することで、dG に対する 8-OHdG の割合を求めた。その結果、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SWCNT 及び MWCNT を 24 時間曝露した MeT-5A から DNA 断片を抽出し、ヌクレアーゼ及びアルカリホスファターゼ処理を行った後、8-OHdG 及び dG 量を測定した。その結果、陽性対照である 50 μM H_2O_2 処理群では対照群と比較して約 2.5 倍の 8-OHdG の増加が観察されたのに対し、SWCNT 及び MWCNT 曝露群においては、未処理群と比較して 8-OHdG 量の有意な変化は認められなかった。

DNA 損傷が CNT 曝露 8 時間及び 24 時間後に観察されたことから、MeT-5A に対し SWCNT 及び MWCNT を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露することで 8 時間、24 時間後における酸化 DNA 修復酵素の発現変動をタンパク質レベルで解析した。MeT-5A より核画分を抽出し、hOGG1 (35kDa) 及び MYH (55kDa) の発現量を経時的に調べた結果、発現量の変化は認められなかった。また、MeT-5A の全抽出物においてミトコンドリア及びサイトゾルに局在する hMTH1 (18kDa) の発現量についても調べたところ、同様に変

化は見られなかった。以上の結果から、本研究で用いた SWCNT 及び MWCNT の曝露 24 時間以内において、MeT-5A 細胞内の代表的な酸化 DNA 除去修復酵素はいずれも量的には変動していない事が示された。

(3) 副次的な成果として、同時に検討に用いた、ナノサイズ酸化チタン (nTiO_2) について以下の結果が得られた。 nTiO_2 を曝露したヒト胸膜中皮由来細胞内における活性酸素種の発生の程度を DCF-DA を用いた蛍光法で評価したところ、有意な ROS の産生増大が観察された。アナターゼ型及びルチル型の 2 種の結晶構造の異なる nTiO_2 をヒト胸膜中皮由来細胞に曝露して酸化的 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG の生、成量の変化を HPLC 法により測定した結果、カーボンナノ中で得られた結果とは異なり、8-OHdG の生成量は、非曝露群に対して優位に増大し、その程度はルチル型 nTiO_2 曝露群によりも、アナターゼ型 nTiO_2 曝露群において顕著であった。また、コメットアッセイの結果においても、ルチル型 nTiO_2 曝露群、アナターゼ型 nTiO_2 曝露群で、共に有意な変化が観察された。

(4) 今後の課題としては、これまでの研究で見出された、CNT が誘発した DNA 損傷作用の機序を明確にするために、変異スペクトルの解析、及び LC/MS/MS を用いた DNA 付加物の解析を行う事が望まれる。次いで CNT 曝露時におけるヒト胸膜中皮細胞内の DNA 損傷修復酵素の発現変動を、qPCR アレイを用いた網羅的な解析を行うことで、どのような反応過程で損傷が起こるのかを推定し、変異を引き起こす CNT の物性及び DNA との直接、あるいは間接的な関わりを解析することで、変異が起こるメカニズムの解明が可能になると考える。本研究は、*in vivo* の実験の結果を考慮し、相補的に進める細胞レベルの検討で、CNT の安全な使用法あるいは取扱いにおける安全基準を定める上で、有益なデータを提示することを目指すものである。

CNT 処理を行った細胞に対して、変異スペクトルを解析して、そのパターンを詳細化することによって、酸化的な損傷とは異なる原因による変異原性発現の機作解明の糸口になる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 小笠原裕樹、梅津憲章、石井一行、ヒト胸膜中皮由来細胞に対するカーボンナノチューブ曝露による DNA 損傷作用、衛生学雑誌、査読有、67 巻、2012、pp. 76-83、DOI: <http://dx.doi.org/10.1265/jjh.67.76>
- ② Ogasawara Y.、Ishii K.、Exposure to chrysotile

asbestos causes carbonylation of glucose 6-phosphate dehydrogenase through a reaction with lipid peroxidation products in human lung epithelial cells. 195, 2010, pp. 1-8,
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.001,

()
研究者番号 :

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ①野口拓巳、小笠原裕樹、石井一行、ナノサイ
イズ酸化チタン曝露による酸化的 DNA 損傷
の評価、日本薬学会(2012)北海道
- ②梅津憲章、金子孝太、寺澤洋輔、
小笠原裕樹、石井一行、ヒト胸膜中皮由来
細胞を用いたナノ粒子の毒性評価、日本薬
学会(2011)静岡
- ③梅津憲章、太田真帆、菅野準、小笠原裕樹、
石井一行、肺胞上皮細胞及び胸膜中皮細胞
を用いたナノ粒子の毒性評価、日本薬学会、
岡山(2010)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原裕樹 (OGASAWARA YUKI)
研究者番号 : 20231219

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者