

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月2日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07217

研究課題名(和文) 歯科用有機材料の経時的な細胞傷害性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a new cytotoxicity assay with a secreted luciferase

研究代表者

堀 美喜 (Hori, Miki)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：40804422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化剤応答配列(ARE)の発現量を簡便に定量化する方法として、レポーターアッセイ法を用いた。レポーター遺伝子として、分泌型高発光性ルシフェラーゼを利用し、新規構築ベクター pARE-pGL を作製した。ヒト肝がん細胞のHepG2細胞を主株とし、ステーブルクローン細胞を樹立した(HepG2-AG11細胞)。歯科有機材料として頻用されるモノマー(MMA, HEMA)刺激に対するARE活性化率が高く、低濃度領域から高感度に細胞に対する酸化ストレス量を計測することが可能となった。また、歯科で用いられる貴金属(金、銀、銅)に対しても、本試験法が適用される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科用材料の細胞毒性評価法はこれまでに細胞の生死のみでの判定であった。代表的な歯科有機材料であるMMAが、細胞内で解毒代謝系の第二相であるグルタチオン抱合を受けて代謝することが判明し、この事実を応用したレポーターアッセイ法により細胞内における解毒代謝量を定量的に測定することが可能となってきた。この方法をより感度よく、さらに経時的な代謝量の推移を測定するため、本実験を計画した。しかしながら、発光タンパク質の「分泌」という過程が混入することにより、ある物質には分泌過程を阻害する因子が働き、生細胞のままARE活性率を測定することが難しいものも存在することが判明した。今後詳細な検証が必要とされる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported an anti-oxidant responsive element (ARE)-firefly luciferase reporter system that is useful for evaluating cytotoxicity of dental resin monomers. In this work, we developed a more sensitive system utilizing HepG2 cells transfected with a newly constructed ARE-Gussia luciferase vector (pARE-pGL). This reporter system responded well to monomers. This reporter assay system can be applied to high-throughput cytotoxicity tests and analysis of oxidative stress effects in live cells. Moreover, ARE activity of metals (Au, Ag and Cu) were evaluated. Luciferase reporter assay showed that Ag stimulated ARE activity in remarkably high ratio than Au. Cu exposure led to cell death occurred. It is possible that silver could be a factor that gives oxidative stress to cells.

研究分野：細胞毒性試験

キーワード：細胞毒性試験 歯科有機材料 HepG2細胞 ルシフェラーゼ 分泌型発光遺伝子 レポーターアッセイ 金属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科材料において、メタクリロイロキシ基を基本骨格とする有機材料は、重合反応による即時硬化する特徴を持っているため、臨床でも頻用される。これらが細胞に与える影響は、ISO 規格において細胞毒性試験法として MTT assay、コロニー形成法などで評価される。しかしながら、これらのいずれの方法においても、細胞の生死のみに焦点をあてた評価法であり、細胞の解毒代謝系の反応を評価することは不可能であった。我々の研究グループではこれまでに、歯科有機材料の最も代表的なメチルメタクリレート (MMA) 刺激下における遺伝子発現を、マイクロアレイ解析にて調べた。結果、解毒代謝系第 2 相のグルタチオン S トランスフェラーゼ (GSTs) 遺伝子の発現を確認した。そこで、GST 遺伝子の上流遺伝子の抗酸化剤応答配列 (ARE) を利用し、レポーターアッセイ法の適応により解毒代謝量の定量化に成功した。このときに用いたレポーター遺伝子は、生物由来のホタルルシフェラーゼを用いたが、この酵素は細胞質内のみに生成され、細胞外へ分泌されることはない。発光量測定時には、細胞膜を溶解する必要がある。すなわち、本評価法では経時的な変化を追うことができない。細胞毒性試験において、細胞の経時の変化を観察することは、細胞が解毒可能な許容範囲を評価することが可能となることが予想され、臨床的な意義が大きい。

2. 研究の目的

細胞膜を溶解することなく発光タンパク質を定量評価できるよう改変し、経時的な変化の観察を可能とする新規評価法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

実験は、5 つの段階に分けて行った。

3-1. レポータータンパク質の改変

レポーター遺伝子に分泌型の高発光性であるガウシアルシフェラーゼ遺伝子を用いた。ARE 配列をタンデムに組み込んだ直下にレポーター遺伝子を組み込んだ。ガウシアルシフェラーゼ遺伝子は、コドンユースージの高い配列に組み替え、タンパク質の生成効率を高めた (コドンオプティマイズ) ものを用いた。作製したベクターを pARE-pGL と呼ぶ。従来のホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いたベクター (pARE-Gluc) と発光量を比較した。

3-2. 遺伝子導入およびステーブルクローン細胞の樹立

ヒト肝がん細胞 (HepG2 細胞) に pARE-pGL ベクターを一過性導入し、MMA およびヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) で刺激後、6 時間でレポータータンパク質を定量評価した。ステーブルクローン細胞の樹立に先立ち、pARE-pGL に、薬剤耐性遺伝子を導入した。樹立したステーブルクローン細胞を HepG2-AG11 細胞と名付けた。ARE はグルタチオン抱合を受ける外来物質のみならず、多剤耐性関連タンパク質 (MRP) による代謝を受ける金属類など、多くの物質に対して活性化されることが報告されている。本実験で構築したステーブルクローン細胞を用いた評価系を、細胞傷害性試験と呼ぶ。

3-3. MMA および HEMA 刺激下における ARE 活性化率の測定

24 ウェルプレートに HepG2-AG11 細胞を 6.0×10^5 cells/mL (500 μ l/well) 播種し、24 時間 CO₂ インキュベータにて培養した。MMA および HEMA を適当な濃度になるよう新鮮な培養液に溶解させた。24 時間培養した HepG2-AG11 細胞の培養上清液を静かに除去し、用意した MMA および HEMA の溶解液をそれぞれのウェルに静かに添加した。また、無刺激のウェルは新鮮な培養液に交換した。6 時間培養した後、培養上清液を 5 mL チューブに 1 mL 採取し、300 G で 5 分間遠心分離機にて培養上清液に含まれる浮遊細胞を沈殿、除去した。発光基質は、セレンテラジン (JNC Co.、横浜、日本) を 5 μ g/mL に調整した。発光基質溶液を 50 μ L に対し、培養上清液を 1 μ L 添加直後に計測した。発光測定はルミノメータ (AB-2200、ATTO 社製、日本) を使用した。また、細胞質内の発光タンパク質量を測定した。培養液を静かに除去し、PBS にて洗浄し、細胞膜溶解液 (Passive Lysis Buffer、Promega 社製、米国) 100 μ L を各ウェルに添加し、15 分間室温で攪拌させ、細胞を完全に溶解させた。濃度を調整した発光基質 50 μ L に細胞溶解液を 10 μ L 添加直後に発光量を測定した。無刺激時の活性率に対するモノマー刺激時の活性率の比率を ARE 活性率として算出した。

3-4. 経時変化の測定

3-3 と同様に、MMA、HEMA の溶解液を用い、刺激後 1,2,4,6,12,24 時間後の ARE 活性率を測定した。

3-5. 歯科用金属の細胞傷害性試験

歯科用金属には、金、銀、銅をはじめとする貴金属系合金が使用される。これらの細胞傷害性を HepG2-AG11 細胞を用い、定量評価を行った。金属の包埋には、冷間埋め込み樹脂 (Epofix、Struers、東京、日本) を用い、完全に硬化後、金属の断面を精密切断機 (isomet、米国) にて露出させた。切断面を回転研磨機にて 0.3 μ m のアルミナにて鏡面研磨し、試料の厚みを平均 1 mm

とした。成形した試料を超純水で超音波洗浄し、乾燥させた。作製した試料を24ウェルプレートに入れ、その上からHepG2-AG11細胞を 6.0×10^5 cells/mL (500 μ L/well)播種し、インキュベータにて6時間培養した。培養後、3-3と同様に発光タンパク質量の測定を行い、ARE活性率を算出した。

4. 研究成果

pARE-pGL を、pARE-Gluc を用いたベクターと比較し、HepG2細胞に一過性に導入し、無刺激時の発光量の差を評価したところ、細胞質内の発光タンパク質量で、261倍、細胞外へ分泌された発光タンパク質量で643倍もの非常に高い発光量を示した。また、HEMA 3 mM に対するARE活性率も同倍率程度を示した。また、薬剤耐性遺伝子の影響を評価したところ、発光量は多少落ちるものの、HEMA 3 mM に対するARE活性率には影響を及ぼさなかった。ステーブルクローン細胞は、発光活性のある、細胞の状態のよい29個のステーブルクローン細胞より、最もHEMA 3 mM 刺激下において活性率の高いものを選択した(HepG2-AG11細胞)。

HepG2-AG11細胞を用いた、MMAおよびHEMA刺激下におけるARE活性率の比較を図1に示す。

低濃度領域においては、従来のホタルルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ法と比較し、ほぼ同様の結果が得られた。しかしながら、MMAは高濃度においては、図2に示すように、分泌されるタンパク質量が一定に頭打ちになった。この結果より、MMAは分泌に関与する代謝経路のいずれかに阻害を起している可能性が示唆された。HEMAについては、培養上清液と細胞質内の発光タンパク質に差は認められなかった。

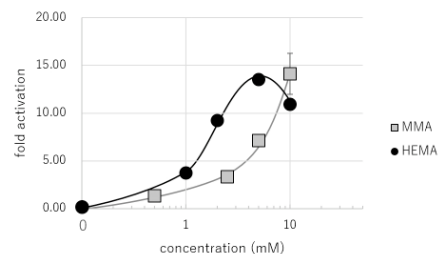


図1. MMA および HEMA 刺激による ARE 活性率

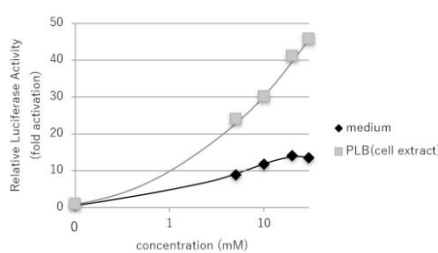


図2. MMA 刺激による培養上清と細胞溶解液の活性率の比較

次に、ARE活性率を経時的に評価したところ、HEMA 3mM 刺激後6時間まではARE活性率はほとんど認められず、また6時間以降は無刺激の発光タンパク質量が増えることによりS/N比の低下を認めた。HepG2細胞は、ヒト肝がん細胞であり、解毒代謝に関与する組織であることから、初期に播種する濃度が高い方がタンパク質合成に有利であることを予備実験であきらかとしている。そのため、経時的な変化を観察するには、細胞の播種濃度の調整が必要であることが判明した。現段階において、本問題は解決しておらず、継続的に実験を行っている。

最後に、歯科用金属における細胞傷害性の評価を行った。図3に各種金属を接触させた時の培養上清液におけるARE活性率を示す。金、銀、銅の純金属に対し、銀に対して非常に高いARE活性を認めた。金はコントロールとほぼ同様となり、銅は細胞死を認めた。すなわち、金は細胞への傷害性を認めず、銀は非常に強い酸化ストレスを与えていることが判明した。細胞質内におけるARE活性率は、銀のみならず、銅にも高い活性を認めた。銅は、細胞分泌能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

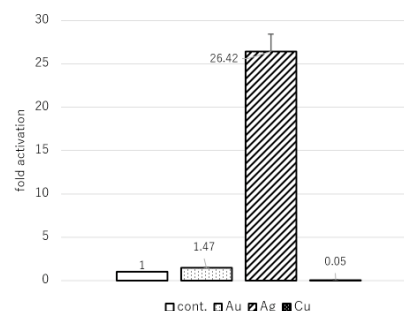


図3. 各種金属接触時のARE活性率

本研究より、歯科有機材料の新たな細胞傷害性の評価系の可能性が示唆された。すなわち、非常に高輝度かつ細胞膜の溶解なく評価が可能となった。さらに、細胞膜あるいは分泌経路への傷害性を考慮しなければならない材料があることが判明した。また、有機材料のみならず、金属材料の細胞傷害性の評価にも適用可能であることが示唆された。本試験法は非常に簡便であり、細胞毒性試験法として、第一次スクリーニングとして有用な情報を提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

堀美喜、金属に対する細胞傷害性について—抗酸化剤応答配列(ARE)レポーターアッセイ法による検討、第73回日本歯科理工学会学術講演会、2019年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。