

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09165

研究課題名（和文）金属酸化物ナノ粒子曝露により放出されるエクソソームとその発がんリスク影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of exosomes released by exposure to metal oxide nanoparticles and their effects

研究代表者

与五沢 真吾（Yogosawa, Shingo）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70381936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：金属酸化物ナノ粒子は化粧品などに広く利用されているが、一方でその曝露影響も懸念されている。酸化亜鉛ナノ粒子をヒト皮膚角化細胞HaCaTに曝露させた際、細胞が放出するエクソソームを解析すると、通常より粒径の小くなること、細胞が分化していることを示唆する分化型ケラチンが含まれることを見出した。そこで酸化亜鉛ナノ粒子による分化誘導について調べると、インボルクリン等の分化マーカーの発現増加が確認され分化が促進されること、分化がPI3K/Akt経路依存的事であること、細胞老化も誘導していることが判明した。また、エクソソームが細胞移動能に及ぼす影響が細胞間で異なる可能性も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化亜鉛ナノ粒子に曝露された細胞が通常とは異なるエクソソームを放出していることが判明した。またエクソソームの解析を通じて、酸化亜鉛ナノ粒子に曝露された細胞が分化することも判明した。細胞の局所的な分化誘導は皮膚の恒常性、バリア機能に影響する可能性もあるが、塗布する場合は、既に分化の進行した最外層の細胞に浸透するだけなので悪影響は少ないと考えられ、むしろその中で浸透した細胞におけるインボルクリン産生増加により、皮膚バリア機能が向上する可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Metal oxide nanoparticles are widely used in cosmetics, but their exposure effects are also a concern. When zinc oxide nanoparticles were exposed to human skin keratinocyte HaCaT, the exosomes released by the cells were analyzed, and it was found that the particle size was smaller than usual, and that some keratins were included, suggesting that the cells were differentiated. We confirmed that the differentiation is PI3K/Akt pathway dependent with increase of involucrin. We also elucidated that zinc oxide nanoparticles induce cellular senescence. In addition, we found that the function of exosomes may differ among cells in their effect on cell migration.

研究分野：衛生学

キーワード：ナノ粒子 酸化亜鉛 皮膚 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化亜鉛、酸化アルミニウム、酸化チタンなどの金属酸化物ナノ粒子(Metal oxide nanoparticles, MONPs)は、比表面積が大きく少量で効果が高いなどの利点から、化粧品や日焼け止めなど UV カットニーズを背景に需要が拡大していた。

MONPs の一次粒子径はナノ化されて小さくとも、二次粒子を形成するため肌へ塗布しても生体内へ侵入せず、角質層内に留まり安全であると考えられていた。しかし一方で炎症反応を誘発するなど、その影響を懸念するような報告もあった。IARC も酸化チタンの発がん性を 2B に分類していた。装飾品等による金属アレルギーの発症に、汗などで生じた金属ナノ粒子が関与しているとの報告(*Nature Nanotechnology* 11(2016), 808)もあった。ナノ粒子の生産と利用が急速に拡大し続ける現況下において、その曝露影響に関する研究の緊急性と充実が求められていた。

一方で、エクソソームが、近傍の細胞のみならず血流にのり遠方の細胞にも働きかけることが注目されていた。しかしながら、MONPs 曝露時におけるエクソソームの役割はほとんど研究されていなかった。

2. 研究の目的

MONPs に曝露された細胞が、通常時とは異なるエクソソームを分泌している可能性を検証する。またどのような物質がエクソソームに含まれるかを解析する。さらに、そのエクソソームが他の細胞に及ぼす影響について調べる。

3. 研究の方法

MONPs として、ZnONPs として酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO-650 (住友大阪セメント)、一時粒子径 20-30nm) を用いて実験を行った。ヒト皮膚角化細胞 HaCaT に対し、ZnONPs を 3 日間曝露させ、細胞増殖抑制効果を WST-8 アッセイにより検討した(細胞増殖測定用試薬 (CCK-8) (同仁化学) を使用)。細胞培養の際は、牛胎児血清 (FBS) 中の牛由来のエクソソームを超遠心法により予め除去したものをを用いた。エクソソーム精製の際は、ZnONPs を死細胞がほとんどみられない、subtoxic な濃度で培地に添加して培養し、培養上清を回収した。培養上清は直径 200nm のフィルターで過後超遠心し、PBS に懸濁させてエクソソームサンプルとした。各サンプルについて、DLS 法により粒径を測定した (zetasizer (Malvern, Sysmex) を使用)。また、このサンプルを SDS-PAGE により解析した。質量分析には Q-Trap LC-MS/MS Systems (Applied Biosystems) を使用した。

分化マーカーをはじめとするタンパク質の発現は、CellLytic (SIGMA-Aldrich) を用いて全細胞抽出液を得、10 または 15% SDS-PAGE 後、PVDF 膜を用いたイムノプロット法により解析した。タンパク質の発現は間接蛍光抗体法による細胞染色でも検討した。細胞老化は細胞老化関連 ガラクトシダーゼ (SA-β-Gal) 染色により検討した。さらに長寿遺伝子として知られ、細胞老化を制御している NAD 依存性ヒストンデアセチラーゼ、サーチュイン 1 (SIRT1) の酵素活性を蛍光基質を用いて測定した (CycLex® SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit (MBL) を使用)。その際の陽性対照にはプロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた。

エクソソームが細胞移動能に及ぼす影響についてはスクラッチアッセイにより評価した。HaCaT の培養密度が 80% になるまで培養し、マイクロピペットでスクラッチし、PBS で洗浄後、培地 (血清を 0.1% にしたもの) と上記の方法で精製したエクソソームが 10 μg/ml になるよう添加した。スクラッチ直後・1-3 日後に顕微鏡下で写真を撮影し、画像処理ソフトウェア Image J でスクラッチ部分 (かき傷) の面積を計測した。

細胞内 ROS 測定は、CM-H₂DCFDA を用いてフローサイトメトリー法により測定した。

4. 研究成果

ZnONPs 曝露により誘導されるエクソソーム、曝露に伴う分化誘導の解析 (図 1、2)

ZnONPs 濃度依存的な増殖抑制効果がみられ、subtoxic な曝露濃度として 20 μg/ml をエクソソーム回収時の濃度とした。ZnONPs 曝露時のエクソソーム粒径は非曝露時に比べて小さくなっていた。SDS-PAGE によりタンパク質成分を解析したところ、分子量 80-90kD 付近に ZnONPs 曝露細胞由来エクソソーム標品にのみ発現しているバンドが観察された。これをピックアップし、質量分析計で分析すると、ケラチン 1/2/5/6B/9/10 がヒットし、分化型ケラチンが含まれていることから曝露された細胞が分化誘導されている可能性が考えられた。そこで、分化マーカーのインボルクリン (INV) の発現を調べると、蛍

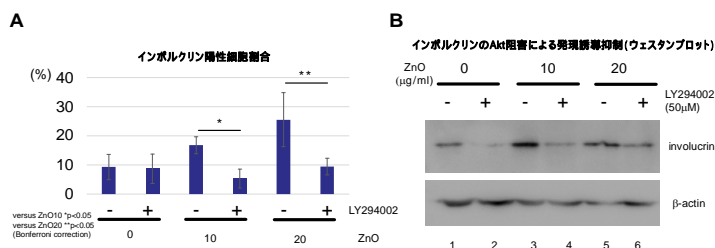
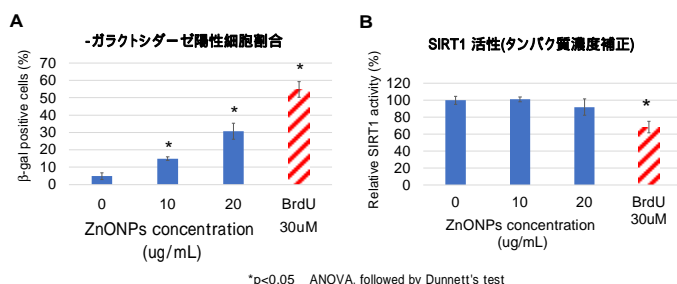


図1 ZnONPs により誘導されるインボルクリンの Akt 経路阻害による抑制

光抗体法による細胞染色でも全細胞抽出液のイムノブロットでも ZnONPs による陽性細胞の増加がみとめられた。このとき Akt のリン酸化増強も観察された。リン酸化を PI3K 特異的阻害剤 LY294002 で阻害すると INV の発現陽性細胞割合は減少した(図 1A)。イムノブロットでも、LY294002 によるインポルクリンの発現増加抑制が確認できた(図 1B)ことから、分化誘導は PI3K-Akt 経路依存的と考えられた。また細胞老化の指標である SA-β-gal 陽性細胞の割合が ZnONPs 濃度依存的に上昇した(図 2A)。一方で SIRT1 の活性は、陽性対照である BrdU 処理群で活性が低下したのに対し、ZnONPs 処理群では SA-β-gal 陽性細胞が増加する濃度で活性の低下がみられなかった(図 2B)。この結果は、高リン血症を伴う慢性腎不全などの疾患でしばしばみられる表皮の老化様変化において、分化マーカーの亢進はみられるが、老化関連タンパク質の発現変化を伴わない(小川ら、加齢皮膚医学セミナー 8、2013、33-8)という報告と類似点があり、興味深い。



*p<0.05 ANOVA, followed by Dunnett's test

エクソソームの細胞移動能に及ぼす影響(図 3)

細胞が放出するエクソソームが細胞移動能に及ぼす影響をスクラッチアッセイにより検討した。ZnONPs 曝露細胞に由来するエクソソームによる影響はみられなかったが、ヒト大腸癌細胞 HT29 由来エクソソームは HaCaT 細胞の移動能を抑制すること、エトポシドを曝露させた HT29 由来エクソソームはその抑制能が低下することを見出した(図 3A)。そこで、各エクソソームを SDS-PAGE するとエトポシド曝露により発現が増加するバンドが観察された。このタンパク質は質量分析によりクラスリン重鎖と判明し、ウエスタンブロットでも確認できた(図 3B)。

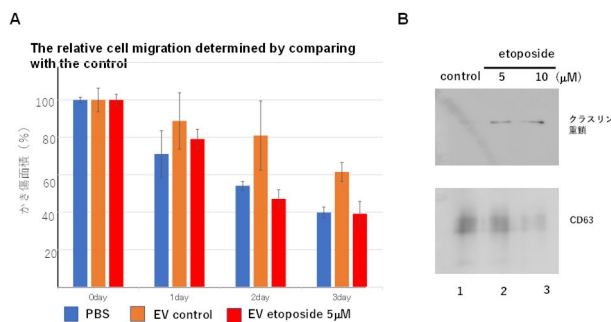


図 3 EV の細胞移動能に及ぼす影響

HT29 細胞由来エクソソームには HaCaT の細胞移動能を抑制する活性があるが、エトポシド曝露によりその活性のないエクソソームが分泌されるようになる可能性が示唆された。Wang らは HT29 由来のエクソソームについて、ヒト大腸癌由来 Caco-2 に対しては細胞移動能が促進されたという報告(Wang X *et al. Oncology rep.* 33, 2445-53, 2015)をしている。HaCaT に対する今回の結果と逆の結果であり、エクソソームは標的細胞により異なる働きをする可能性が考えられる。またエトポシド処理をすることによりエクソソームの細胞移動能が抑制され、このときエクソソーム中でクラスリン重鎖の発現が増加していることを見出した。その関連は不明だが、クラスリンはしばしばエクソソーム中に見出され、細胞に取り込まれる際にクラスリンを介する場合もあるので、エクソソームの細胞との親和性に影響している可能性も考えられ、大変興味深い。

ZnONPs 曝露による細胞内 ROS 蓄積(図 4)

チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞に ZnONP を高濃度で曝露させると小核が誘導され、その際細胞内に ROS が蓄積することを明らかにした。連続処理法では処理後 6 時間で細胞内 ROS の蓄積がみられる。S9 混合物を用いた代謝活性化処理法では ZnONPs を 6 時間曝露後 ZnONPs を除去してから、S9 混合物を添加して 18 時間後の細胞内 ROS をみている。この 18 時間の回復期間で細胞内 ROS も通常に回復するが、S9 混合物存在下では回復しないことがわかった。この条件下で CHL/IU には小核が誘導され、電子顕微鏡下の観察でミトコンドリアが障害されていることもわかった。ZnONPs はミトコンドリア障害に起因するスーパーオキシドラジカルによる酸化ストレスを介して遺伝毒性を引き起こすことが示唆された。また S9 混合物を添加した実験で ROS 蓄積が増加していることから、代謝活性化により遺伝毒性が増加する可能性が考えられる(Yanagisawa H, *et al. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 834,25-34,2018)。

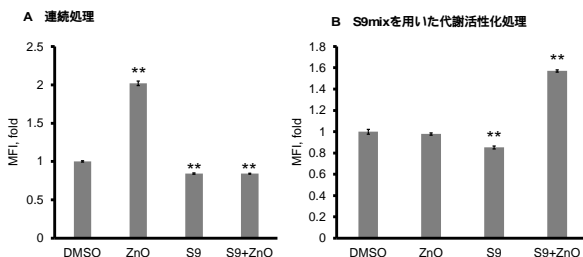


図 4 ZnONPs による細胞内 ROS 蓄積

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 与五沢真吾、柳澤裕之	4. 巻 42
2. 論文標題 職業性ばく露と細胞外分泌小胞～エクソソームを中心として	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 産業医学ジャーナル	6. 最初と最後の頁 100-103
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 Yanagisawa Hiroyuki, Seki Yoshiko, Yogosawa Shingo, Takumi Shota, Shimizu Hidesuke, Suka Machi	4. 巻 834
2. 論文標題 Potential role of mitochondrial damage and S9 mixture including metabolic enzymes in ZnO nanoparticles-induced oxidative stress and genotoxicity in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 25～34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mrgentox.2018.07.003	査読の有無 有
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 Akiyama M, Sowa Y, Taniguchi T, Watanabe M, Yogosawa S, Kitawaki J, Sakai T	4. 巻 25
2. 論文標題 Three Combined Treatments, a Novel HDAC Inhibitor OBP-801/YM753, 5-Fluorouracil, and Paclitaxel, Induce G2 Phase Arrest Through the p38 Pathway in Human Ovarian Cancer Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Research	6. 最初と最後の頁 1245-1252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096504017X14850164661097	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 柳澤裕之、栄兼作、木戸尊将、吉岡亘、与五沢真吾、須賀万智	4. 巻 61
2. 論文標題 生活習慣病と微量金属元素	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床検査	6. 最初と最後の頁 164-167
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 与五沢真吾, 岩本武夫, 柳澤裕之
2. 発表標題 酸化亜鉛ナノ粒子曝露によりヒト角化細胞より放出される細胞外分泌小胞の解析
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 与五沢真吾, 岩本武夫, 柳澤裕之
2. 発表標題 ヒト大腸がん由来HT29細胞の放出する細胞外分泌小胞が細胞移動能に与える影響
3. 学会等名 第90回日本衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 与五沢真吾, 柳澤裕之
2. 発表標題 インスタントコーヒーのヒト大腸がん培養細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第91回日本産業衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井 敦美, 与五沢真吾, 柳澤裕之
2. 発表標題 大腸がん細胞の細胞外小胞が表皮角化細胞の移動能に与える影響
3. 学会等名 第135回成医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 与五沢真吾
2. 発表標題 食品成分によるがん予防の可能性
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 与五沢真吾、酒井敏行、柳澤裕之
2. 発表標題 エコールとブラシニンの併用処理によるヒト大腸がん細胞の増殖抑制効果の増強
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤俊之、西ヶ谷温希、与五沢真吾、柳澤裕之
2. 発表標題 エトボシンドのばく露によるヒト大腸がん細胞HT29が分泌する細胞外小胞の構成タンパクの変化
3. 学会等名 第134回成医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kido T, Ishiwata S, Yogosawa S, Yoshioka W, Tsunoda M, Suka M, Yanagisawa H
2. 発表標題 Mechanism of inflammatory Response and the Effect of IL-4 on Th2 Lymphocytes Derived from the Spleen of Zinc-Deficient Rats
3. 学会等名 57th Annual Meeting and ToxExpo（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡亘、木戸尊將、与五沢真吾、須賀万智、池上雅博、柳澤裕之
2. 発表標題 炭酸リチウムが引き起こす尿濃縮障害を伴う水腎症
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木戸尊將、石渡賢、与五沢真吾、吉岡亘、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏状態におけるTh2リンパ球を介した炎症応答の機序解明
3. 学会等名 第24回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木戸尊將、石渡賢、与五沢真吾、吉岡亘、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 亜鉛欠乏の脾臓Th2リンパ球への影響とIL-4投与及び亜鉛補充の効果
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 与五沢真吾、岩本武夫、柳澤裕之
2. 発表標題 酸化亜鉛ナノ粒子曝露による ヒト皮膚角化細胞の分化誘導
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 与五沢真吾、岩本武夫、柳澤裕之
2. 発表標題 亜鉛酸化ナノ粒子曝露によるヒト皮膚角化細胞の分化誘導の可能性
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学ホームページ 基礎・臨床講座/環境保健医学講座
http://www.jikei.ac.jp/academic/course/14_hokeni.html
 東京慈恵会医科大学環境保健医学講座ホームページ
<https://plaza.umin.ac.jp/~jikphem/>

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
研究分担者	柳澤 裕之 (Yanagisawa Hiroyuki) (10200536)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------