

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 5 月 9 日現在

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390526
 研究課題名(和文) 遷移金属イオンの生体防御系細胞内での輸送システムの解明と生体安全性との関連評価
 研究課題名(英文) Evaluation on clarification of transport system of transition metallic ions inside body-defense cells and its association with bio-safety
 研究代表者
 平 雅之(TAIRA MASAYUKI)
 岩手医科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：60179398

研究成果の概要(和文)：マクロファージを銅イオン配合培養液で培養し、定量 PCR で調べたところ、細胞膜トランスポーターSLC31A1 遺伝子と小胞体トランスポーターATP7A/7B 遺伝子及び銅輸送シャペロン ATOX1 遺伝子の発現は、いずれも銅イオン濃度が 200 $\mu\text{mol/L}$ 以上では低下した。高濃度の細胞内銅イオンが十分排出(輸送)されないと、過剰銅イオンによる DNA 傷害(DNA 鎖切断)を生じ、細胞死に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We cultured macrophage in the medium with copper ions, and evaluated gene expression by quantitative PCR. All expressions of cell-membrane transporter SLC31A1 gene, ER transporter ATP7A/7B genes and copper transport chaperon ATOX1 gene declined when the copper content was larger than 200 $\mu\text{mol/L}$. When high amounts of copper ions were not removed (transported) from the macrophage, it was considered that intracellular excessive copper ions might cause DNA damage (DNA-strand breakage), leading to cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：歯科理工学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学 7406

キーワード：歯学、生体材料、細胞・組織、遷移金属イオン、遺伝子、銅イオンシャペロン、銅イオントランスポーター、損傷遺伝子修復酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 貴金属合金と非貴金属合金は現在でも歯科修復・補綴治療に多用されているが、口腔内での化学的・物理的作用によって遷移金属(銅、鉄、ニッケル、コバルト、チタン等)のイオンが溶出し、一部の患者に口腔組織炎

症や金属アレルギー症状を惹起している。これらの症状の診断と治療のために、研究代表者はこれまで金属イオンがマクロファージに及ぼす障害作用を形態学的、組織学的及び生化学的に評価してきた。遷移金属イオンのニッケルイオンとチタン粒子は炎症性サイ

トカインやフリーラジカル NO の産生を増加させ、DNA に傷害を生じ、細胞死を誘導することを確認した。また、高濃度の銅イオンが作用すると、細胞内に脂質蓄積を伴う泡沫化を生じ、核内 DNA に酸化的修飾を生じ、脂質に酸化損傷を生じることを見いだした。これらの複数の細胞障害現象がマクロファージに細胞死をもたらしたが、成因については不明な点が多く、その解明にはマクロファージ内における金属イオンの細胞内輸送システムの理解が必要と考えられた。関連する研究は、歯科生体材料の分野では、国の内外ともに全く見当たらなかった。そこで、歯科用金属材料の安全性評価を革新的に高めることを究極目標として、本研究「マクロファージ内における遷移金属イオンの細胞内輸送システムの解明」を立案した。

(2)メンブレントラフィックとは細胞内の小器官(オルガネラ)の間で行われるダイナミックな小胞(膜)の輸送システムを指す。銅イオンは細胞膜上の銅トランスポーター(Ctr1)で細胞内に取り込まれ、複数の銅シャペロン蛋白によって特異的に小器官に輸送される(図1)。さらに、生体において免疫を担うマクロファージはファゴサイトーシスによって小器官(ファゴゾーム)を形成し異物を取り込む。いずれの場合も、トランスポーター(あるいはCa/重金属イオンチャンネル)とシャペロンの輸送システムが存在すると考えられるが、その詳細は不明であった。メンブレントラフィックに破綻があると微量の金属イオンでも重篤な細胞障害に繋がる可能性があるため、その機構の解明は極めて重要と考えられた。

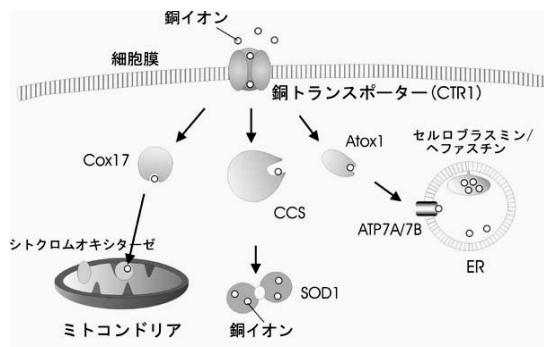


図1 銅トランスポーターと銅シャペロン (CTR1, ATP7A/7B, Cox17, CCS and Atox1)

(3) 欧米では、非貴金属合金の歯科利用割合が年々低下している。北欧ではニッケルクロム合金はもとよりアマルガムの使用まで禁止されている。欧米の金属アレルギー試験会社 (MELISA) によるとインプラントに安全とされているチタンに対しても 3%の患者が

感受性を示すことが報告されている。しかるに、国の内外において金属材料による細胞組織障害の機構が十分に解明されていない。本研究は、その解明を目的として、歯科用合金に特徴的な遷移(重)金属イオンの生体防御系細胞内における輸送に関する検討を行うものであり、これからの(遷移)金属材料の生体安全性評価に不可欠と考えられた。また、本研究は患者ごとに異なる金属材料への感受性の違いの解明や医療用金属材料(整形外科金属材料等)の生体安全性評価にも役立ち、社会的に大きな貢献が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 銅は歯科用貴金属合金に配合されることが多く、口腔内腐食でイオンとして溶出すると微量であっても口腔組織を傷害する。また、銅は生体に必須であると同時に過剰量存在すると毒性を生じることが知られている。本研究では、銅イオン配合培地でマクロファージを培養し、銅イオンが銅イオン輸送関連蛋白質(チャンネルとトランスポーター)の遺伝子発現に及ぼす影響を(銅イオン)濃度依存的に検討した。

(2) 低毒性 IC90 濃度の銅イオンがマクロファージの蛋白発現に及ぼす影響をプロテオーム解析によって調べた。また、定量PCRによる遺伝子発現から蛋白発現を検証した。

3. 研究の方法

(1) ①ヒト単球様細胞(THP-1)を 200 nM PMA と 10% Serum 配合 RPMI1640 培地で 2 日間培養しマクロファージに分化させた。次いで、銅イオン (Cu^{2+}) を 0 から 500 $\mu\text{mol/L}$ 配合する試験培地中で 1 日間培養し、PBS(-)洗浄後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) によって Total RNA を採取した。②遺伝子発現解析は定量PCR装置 (TP800, Takara) によって行った。試薬には PrimeScript RT Reagent Kit, SYBR Premix Ex Taq II, Perfect Real Time サポートシステムのプライマー(いずれも Takara) を用いた。定量は $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法によって行った。

(2) ①銅イオンを 1000 $\mu\text{mol/L}$ まで配合する培地中で(1)のマクロファージを 1 日間培養し、細胞生存率を Cell Counting Kit 8 (同仁化学) で調べたところ、IC90 銅イオン濃度は 100 $\mu\text{mol/L}$ であった。②IC90 濃度銅イオンでマクロファージを 1 日間培養し PBS(-)で洗浄後、セルスクレーパーで剥がし遠心・上清廃棄によってセルペレットとした。通法に従い、8-M の urea 緩衝液に溶解させ、IPGphor (GE Health Bio-Science) を用いた 2 次元電気泳動によってスポット状に分画

した。対照のマクロファージと比較して IC90 濃度銅イオンによって発現増加した蛋白スポットを切り出し、alkylation後、トリプシン処理、濃縮し、Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass 装置 (Applied Biosystems) を用いて質量分析を行った。ペプチド fingerprint 照合には Mascot Search を用いた。③②の試験と対象のマクロファージから total-RNA を採取し、定量 PCR 実験から遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ①銅イオンを細胞内に取り込むトランスポーター遺伝子 CTR1 に相当する SLC31A1 と SLC31A2 の遺伝子の発現はいずれも銅イオンが 0 から 100 $\mu\text{mol/L}$ までは変化がなく、200 $\mu\text{mol/L}$ 以上になると著しく低下した (図 2)。ATP7A と ATP7B の遺伝子発現も類似の傾向が見られた。ATP7B は特に小胞体 (ER) からの銅イオンの排出に関わるため、その低下は銅イオンの細胞内蓄積に直結すると考えられた (図 3)。この知見は世界初と思われる。

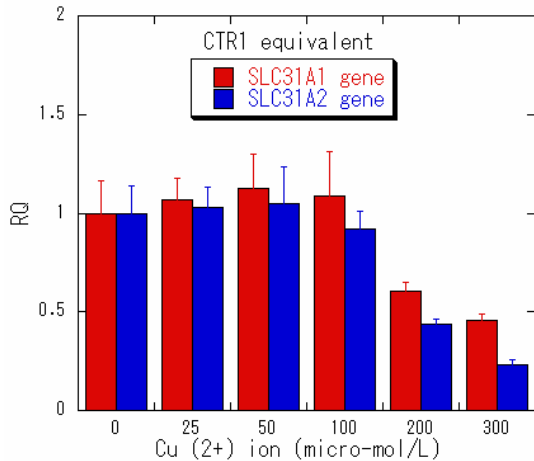


図 2 銅イオントランスポーターの遺伝子発現 1 (銅イオン濃度の影響)

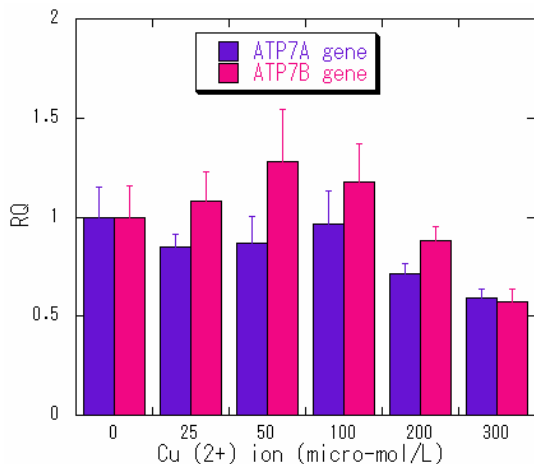


図 3 銅イオントランスポーターの遺伝子発

現 2 (銅イオン濃度の影響)

② 銅イオンを運ぶシャペロンについては、ミトコンドリアへ運ぶ Cox17 の遺伝子は銅イオン濃度依存的に発現増加し、SOD1 に運ぶ CCS の遺伝子は濃度依存的に発現減少した (図 4)。ER に運ぶ ATOX1 の遺伝子発現は銅イオンが 200 $\mu\text{mol/L}$ 以上で減少した (図 5)。

③ 4つの DNA 損傷修復酵素 (表 1) 遺伝子に及ぼす銅イオン量の影響を検討した。MRE11A の遺伝子は銅イオン濃度依存的に、当初、発現増加したが、200 $\mu\text{mol/L}$ 以上では発現が低下した (図 6)。他の 3つの DNA 損傷修復酵素である MSH3、RAD51 と XPA の遺伝子の発現変動も MRE11 遺伝子に近似していた (図 7)。核内に輸送された高濃度の銅イオンが、DNA 修復酵素の遺伝子発現を濃度依存的に阻害し、その結果、細胞生存率が低下すると考えられた (図 8)。この知見は既知だが重要である。

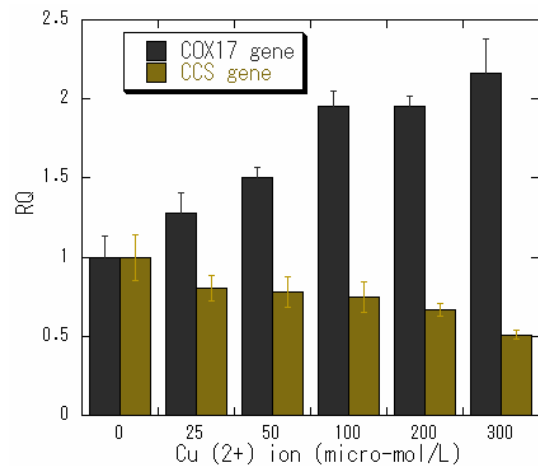


図 4 銅イオン輸送シャペロンの遺伝子発現 1

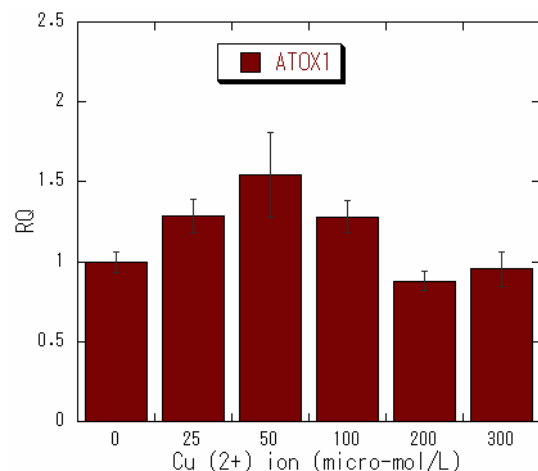


図 5 銅イオン輸送シャペロンの遺伝子発現 2

④ 過剰な銅イオンが細胞内でERに蓄積され異常蛋白質を作る機構の概念図を右欄(図9)に示した。フリーとなった銅イオンはメタルチオネインMT1で解毒されることも本研究で確認した。これらの機構の解明は国の内外で少なく、今後の継続研究が期待される。

表1 4つのDNA損傷修復酵素

MRE11A	= Double-strand break repair
MSH3	= DNA mismatch repair
RAD51	= Double-strand break repair
XPA	= Nucleotide excision repair

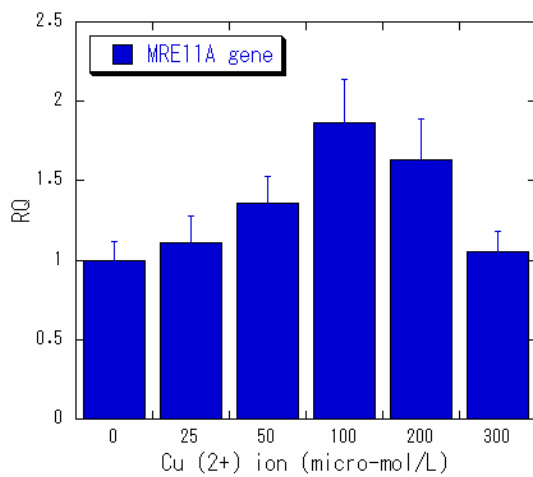


図6 DNA損傷修復酵素遺伝子の発現に及ぼす銅イオン量の影響1

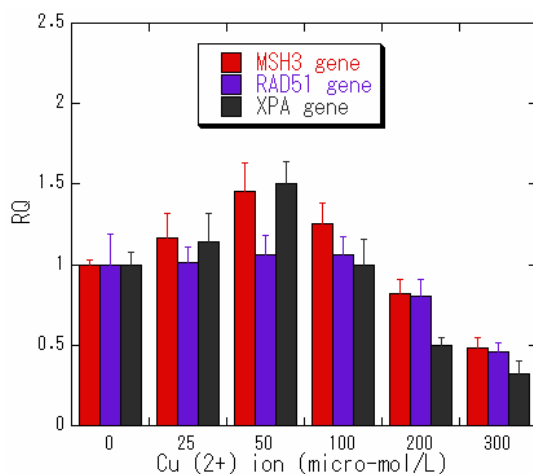


図7 DNA損傷修復酵素遺伝子の発現に及ぼす銅イオン量の影響2

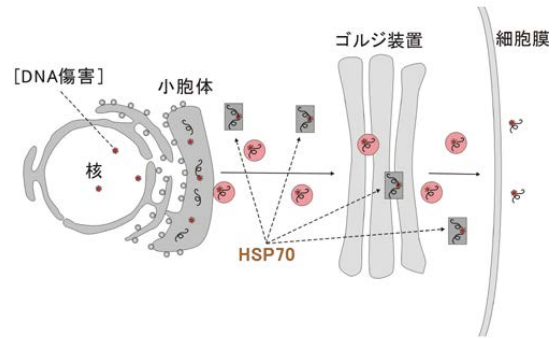


図8 銅イオンの核内DNA傷害を示す模式図

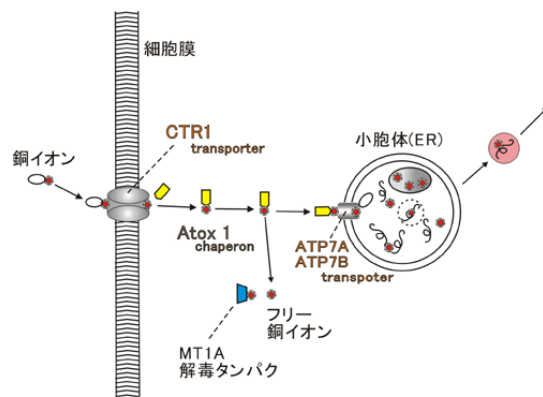


図9 銅イオンのERへの輸送と異常蛋白質の生成を示す模式図

(2) ①IC90濃度銅イオンによって5つの蛋白スポットが有意に発現増加した(図10)。質量分析の結果、そのうち4つの蛋白スポット(2,3,4,5)がHeat Shock 70kDa Protein(HSP70)1A/1Bに起因する($p < 0.05$)ことが確認された。残り1つの蛋白スポット(1)はribonucleoprotein 200 kDa helicase 05であった($p < 0.05$)。銅イオンはマクロファージ内で蛋白質を変性(架橋、フォールディング妨害)するため、HSP70が多量に産生され蛋白の変性による悪影響を防ぐ働き(防御)が生じたと考えられた。②定量PCR実験結果から、IC90濃度銅イオンによってHSP70の合成を誘導するHSP1A/1B遺伝子の発現が30倍程度増加することが確認された(図11)。銅イオンによるHSP1A/1B遺伝子の有意な発現増加がHSP70蛋白の発現を誘導したと判断された。HSP70は小胞体、輸送小胞やゴルジ装置中で、銅イオン含有・変異蛋白を分解し、正常蛋白に戻す役割を有した(図8)とも考えられた。③全体を通じて、銅イオンは細胞内で活発に輸送され、低濃度なら金属イオン解毒蛋白やDNA損傷修復酵素の働きで無毒化されるものの、量が多いとDNA傷害(DNA strand break)をもたらし、細胞死(ネクロシス、アポトーシス)に繋がると考えられた。

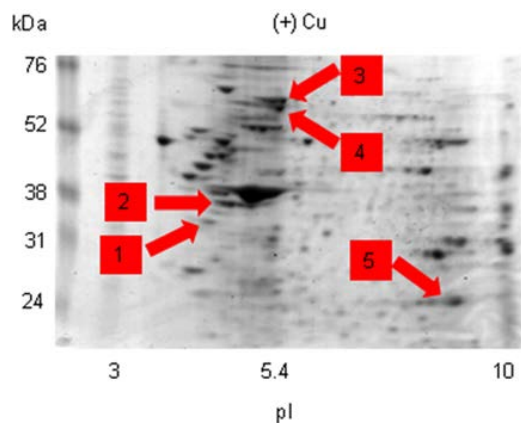


図 10 IC90 銅イオンによる特異的蛋白発現を示す 2D 電気泳動図

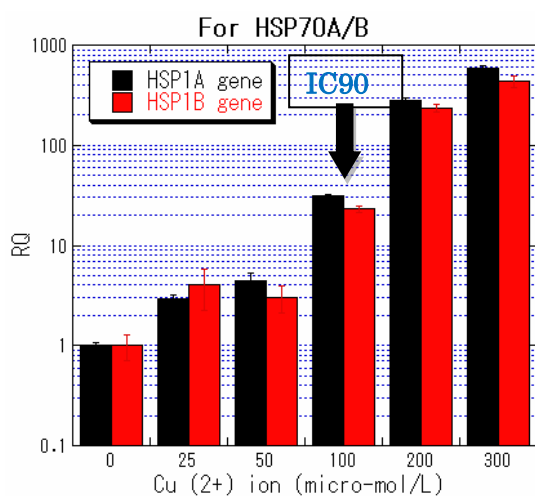


図 11 銅イオンによる HSP1A/1B 遺伝子の発現 (銅イオン濃度の影響)

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 9 件)

- ① Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: Macrophage reaction against sub-micron titanium particles, *Interface Oral Health Science* 2011, Part6: 283-284, 2012. 査読有
[DOI 10.1007/978-4-431-54070-0_84](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54070-0_84), ©Springer
- ② Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M. and Kimura, S.: Quantitative real-time RT-PCR analyses of DNA-damage-recovery-related gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264 when exposed to IC50 nickel ions, *Nano-Biomedicine*, 3:

294-299, 2011. 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/nano/3/2/3_2_294/article

- ③ Taira M., Shimoyama, Y., Kagiya, T., Sasaki, M., Nezu, T., Harada, H. and Kimura, S.: Proteome analyses of human macrophages exposed to low cytotoxic IC90 copper (2+) ions, *Dental Mater. J.*, 30: 293-299, 2011. 査読有
<http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2010-088>
- ④ 平 雅之、齋藤設雄: 歯科技工における粉塵について知っておきたいこと、*日本歯技*, 494: 33-40, 2010. 査読無
http://www.nichigi.or.jp/about_nichigi/nihonshigi.html
- ⑤ Saitoh, S., Sasaki, K., Nezu, T., Taira, M., Shimoyama, Y., Sasaki, M., Kimura, S. and Ishizeki, K.: Histological and TEM observation of subcutaneous tissues exposed to particulate copper, nickel and titanium, *J. Oral Tissue Eng.*, 8: 102-106, 2010. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarde/8/2/8_2_102/article
- ⑥ Taira, M., Kagiya, T., Harada, H., Sasaki, M., 他 4 名: Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21: 267-275, 2010. 査読有
[DOI 10.1007/s10856-009-3834-x](https://doi.org/10.1007/s10856-009-3834-x)
- ⑦ Taira, M., Sasaki, M., Sasaki, K., Saitoh, S., Nezu, T., Kimura, S. and Araki, Y.: DNA microarray analyses of the effects of LPS-stimulation and IC50 nickel ions on gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264, *Nano-Biomedicine*, 1: 59-69, 2009. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/nano/1/1/1_1_59/article
- ⑧ Taira, M., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y.: Characterization of aerosols and fine particles produced in dentistry and their health risk assessments, *Nano-Biomedicine*, 1: 9-15, 2009. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/nano/1/1/1_1_9/article
- ⑨ Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M., Sasaki, K., Saitoh, S., 他 4 名: First-stage genome-wide gene expression analyses of human mesenchymal stem cells exposed to IC50 Ni (2+) ions, *J. Oral Tissue Eng.*, 7:

107-120, 2009. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarde/7/2/7_2_107/article

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 平 雅之: THP-1 細胞を用いたチタン微粒子、銅イオンと TEGDMA モノマーの細胞障害性の評価、日本動物実験代替法学会第 24 回大会(招待講演)、2011 年 11 月 12 日、仙台市
- ② 平 雅之: TEGDMA に曝された時の THP-1 単球の異物代謝並びに炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現評価、第 58 回日本歯科理工学会学術講演会、2011 年 10 月 22 日、郡山市
- ③ 鍵谷忠慶、平 雅之 他 2 名: マクロファージが銅イオンに暴露された時の microRNA の発現について、第 53 回歯科基礎医学会学術大会、2011 年 10 月 2 日、岐阜市
- ④ Saitoh, S., Taira, M. (4 番目) 他 2 名: Histological and TEM observation of subcutaneous tissues exposed to particulate pure metals, International Dental Materials Congress 2011 (IDMC2011), 2011 年 5 月 28 日、Soul, Korea
- ⑤ 齋藤設雄, 佐々木かおり, 根津尚史, 平雅之, 下山 佑, 佐々木 実, 木村重信, 石関清人: 3 種類の純金属に対するマウス背部皮下における生体組織反応の評価、岩手医科大学歯学会第 36 回総会、2010 年 12 月 4 日、盛岡市
- ⑥ 平 雅之: 低毒性 IC90 濃度の銅イオンがマクロファージの蛋白発現に及ぼす影響評価: 第 32 回バイオマテリアル学会大会、2010 年 11 月 30 日、京都市
- ⑦ 齋藤設雄, 佐々木かおり, 根津尚史, 平雅之: 皮下埋入した金属材料に対する生体組織反応の基礎的評価、第 56 回日本歯科理工学会学術講演会、2010 年 10 月 10 日、岐阜市
- ⑧ 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史: マクロファージ内における銅イオン輸送蛋白質の遺伝子発現解析、第 56 回日本歯科理工学会学術講演会、2010 年 10 月 9 日、岐阜市
- ⑨ 齋藤設雄, 佐々木かおり, 根津尚史, 平雅之: 皮下埋入した金属材料が生体組織に及ぼす影響、ナノ・バイオメディカル学会第 3 回大会、2010 年 9 月 17 日、横浜市
- ⑩ 平 雅之、荒木吉馬: 高濃度の銅イオンがマクロファージに及ぼす傷害作用に関する研究、第 31 回バイオマテリアルズ学会大会、2009 年 11 月 17 日、京都市
- ⑪ 平 雅之、佐々木かおり、齋藤設雄、根

津尚史、荒木吉馬: IC10%濃度の銅イオンで培養したマクロファージの TEM 形態観察と細胞内銅イオン量の EDX 測定、第 54 回日本歯科理工学会学術講演会、2009 年 10 月 1 日、鹿児島市

- ⑫ 平 雅之、佐々木かおり他 3 名: IC50 ニッケルイオンがヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現に及ぼす影響評価、第 7 回日本再生歯科医学会、2009 年 9 月 12 日、北九州市
- ⑬ 平 雅之、佐々木 実、木村重信: IC50 濃度ニッケルイオンが LPS 活性化マクロファージの DNA 傷害修復関連遺伝子の発現に及ぼす影響、第 51 回歯科基礎医学会学術大会、2009 年 9 月 10 日、新潟市
- ⑭ 平 雅之、荒木吉馬: IC50%ニッケルイオンと LPS がマクロファージの全遺伝子発現に及ぼす影響評価、ナノ・バイオメディカル学会第 1 回大会、2009 年 7 月 18 日、札幌市
- ⑮ 平 雅之、佐々木かおり、齋藤設雄、根津尚史、荒木吉馬: 銅イオンがマウス多形核白血球(好中球)の活性酸素産生に及ぼす濃度依存的影響、第 53 回日本歯科理工学会学術講演会、2009 年 4 月 11 日、東京都

〔図書〕(計 1 件)

- ① 平 雅之 他 57 名、9 章 ナノ粒子の細胞毒性評価、ナノ粒子のリスク評価と安全性対策 初版、亙理文夫 監修、6p (p.90-p.95)、フロンティア出版、2011

〔その他〕

ホームページ等
<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/dmst/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60179398

(2) 研究分担者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA TADAYOSHI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号: 30405774

(3) 連携研究者

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40264056
佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 40187133