

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590766

研究課題名(和文)カーボンナノチューブ曝露により誘発された中皮細胞における遺伝子損傷作用の解析

研究課題名(英文)Analysis of DNA damage induced by exposure of carbon nanotubes in mesothelial cells

研究代表者

小笠原 裕樹 (Ogasawara, Yuki)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20231219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、MeT-5A細胞を用いて脂質過酸化物質及びアルデヒドの生成を調べた。その結果、TBA値の有意な増加が見出され、過酸化脂質修飾DNA付加体の生成が推定された。脂質過酸化の亢進から、スーパーオキシド消去酵素であるSOD活性の変化を調べたところ、CNT曝露においてSOD活性が有意に減少した。従って、その減少により細胞内過酸化が進み、遺伝子や蛋白質の酸化が起こり増殖が抑制される可能性も考えられた。また、修復酵素XRCC-1はCNT曝露においてタンパク質で2時間後に、mRNAで1～2時間後において有意に発現が上昇した。このことから早い時点でDNA損傷修復系が活性化していることが予想された。

研究成果の概要(英文)：The present study suggests the toxic effects induced by exposure of single- and multi-walled carbon nanotubes (SWCNT and MWCNT) on Met-5A cells, a human lung mesothelial cell as a model system. Met-5A cells were cultured with SWCNT or MWCNT, and various cellular responses were determined to estimate the toxicity of exposure to CNTs. In this study, we have demonstrated that exposure of Met-5A cells to CNTs led to up-regulation of DNA repair enzymes expression. Using qRT-PCR and Western blotting analyses, we have shown that the CNTs-mediated increase in XRCC1, a DNA repair enzymes. Moreover, the decrease in SOD activity suggested the attenuation of protective mechanism against ROS in CNT treated cells. Studies carried out on the effect of CNTs on TBA-RS levels in MeT-5A cells, indicated that aldehyde formation was induced by exposure to CNTs. These results indicated that CNTs might exert genotoxicity via superoxide generation followed by DNA oxidation.

研究分野：分析化学

キーワード：多層カーボンナノチューブ 中皮種細胞 DNA損傷 脂質過酸化 修復酵素 暴露指標

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーは、産業界において夢の化学物質として期待され、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、人類に大きな貢献をもたらすものと期待されている。しかし、既に使用されているナノ物質のうち、カーボンナノチューブ(CNT)やナノサイズ酸化チタンの生体影響は、今日、灰色という評価を受けながらも、結論が保留されている状況である。悪性中皮腫を引き起こすことが明らかとなったアスベストとの物性の類似性から、その比較においても研究が進められている。高木らは p53 ヘテロノックアウトマウスに多層(MW)CNT を腹腔内投与したところ、短期間に高頻度で中皮腫が発生したことを報告した(J.Toxicol.Sci., 2008)。次いで、坂本らは、健常なラットを用いた投与実験においても同様に中皮腫が生じる事を明らかにした(J.Toxicol.Sci., 2009)。Shvedova らは、SWCNT の投与実験で、曝露条件の違いによる肺の繊維化、酸化ストレス、変異原性について比較検討を行っている (Am. J. Phys. Lung Cell Mol. Phys., 2008)。更に Mercer らはマウスに MWCNT を咽頭吸入させ、観察した結果、胸膜内壁に到達する事を示した (Part. Fibre. Toxicol., 2010)。それら動物実験の結果から、CNT のヒトでの発がん性が危惧される現状にあるが、研究が不十分であるとして、我が国における有害性の評価は曖昧である。一方、アスベストによる中皮腫の発生メカニズムについては、明確化されたとは言えないが、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 量の増加や酸化 DNA 除去修復酵素活性の変動などから、酸化的な DNA 損傷が主たる要因であると考えられている (Fung, Carcinogenesis, 1999)。我々は、平成 21 年よりヒト胸膜中皮細胞 MeT-5A を用いて、CNT 曝露による酸化的傷害に注目し、そのリスク評価の基礎となる研究に取り組んだ。その結果、単層(SW)CNT、及び MWCNT は、細胞毒性及び DNA 損傷作用を有する事を明らかにした (日本衛生学雑誌、2012)。しかし、我々の研究においては、8-OHdG 量と酸化 DNA 除去修復酵素の変動は見られなかった。Tabet らは MeT-5A に対して MWCNT とクロシドライトを曝露し、10 及び 100 µg/mL の濃度における MWCNT 曝露において細胞毒性を認めているが、アポトーシス及び酸化ストレス応答は観察されなかったとしている (J. Toxicol. Environ. Health A, 2009)。我々も、アスベストが肺胞上皮細胞に与える酸化傷害に注目し、アルデヒド付加タンパク質の生成を証明した (Toxicol. Lett., 2010)。次いで、その物性がアスベストに近い CNT の中皮細胞への影響を解明すべく研究を行ってきた。CNT を用いて得られた研究結果は、アスベストの実験で明らかとなった現象とは乖離しており、CNT の曝露にお

いては、DNA 損傷の機序が酸化的な損傷に呼応した切断、除去修復であることを支持しなかった。従って、これまで本研究で観察された DNA 損傷のメカニズムは少なくとも混入する遷移金属に由来するものではない。実際に、Karlson らは肺胞上皮由来細胞に対して様々なナノ粒子を曝露し、そのラジカル発生や DNA 損傷を見出しているが、MWCNT の曝露では活性酸素種の発生は見られず、その一方で コメットアッセイにより DNA 損傷作用がある事を観察している。しかし、彼らはその機序については言及していない (Chem. Res. Toxicol., 2008)。著者の研究において見出された DNA 損傷作用の機序も、現時点において明らかではなく、DNA の単純な酸化によって起こるものではないことが示唆されたため、別な視点から本研究を継続していく事が必要となった。そこで、遺伝毒性に焦点を絞り、CNT の DNA 損傷作用の機序を明確にするために、本研究を考案した。本研究の主眼は、CNT 曝露によってどのような遺伝子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詳細化する事にある。

2. 研究の目的

現在では、未だ生産・輸入量が少ないと楽観視されている感のあるカーボンナノチューブ(CNT)の発癌リスクを明確にすることは、取扱作業従事者にとっては、焦眉の急を要する産業衛生上の重要事であると考えられる。これまでの申請者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、本研究では、CNT 曝露により起こる DNA 付加物の解析を行う。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について、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。本研究は、これまでに報告された in vivo での実験結果を考慮し、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。本研究では、その期間内に、いまだ不明瞭なナノ粒子の遺伝毒性を引き続き評価するため、CNT をヒト胸膜中皮細胞に対し曝露したときに観察された DNA 損傷が、どのような変異体あるいは付加体となって惹起されたのかを明らかにする。次いで、現在知られる全ての DNA 損傷修復酵素群の変動に着目し、CNT 曝露に起因する損傷のタイミングとパターンを明確化し、その作用機序の解明を目標とする。具体的には、胸膜中皮細胞において CNT 曝露によって誘導される変異の状態を詳細に調べ、共通する変異サイトを見出すことを試

みる。次いで CNT 曝露による DNA 損傷修復酵素遺伝子の発現変動を qPCR アレイ法により解析する。DNA 修復あるいは酸化ストレスパスイエイに關与する遺伝子パネルに焦点を絞った qPCR アレイの結果において、再現性が得られた時点で、当該遺伝子に相当する損傷修復酵素あるいはストレス応答性タンパク質の発現及び活性変動を、タンパク質レベルで確認する。2 年目以降に、その DNA 損傷修復酵素あるいは抗酸化酵素を胸膜中皮細胞内で過剰発現させ、同様の CNT 曝露を行い、DNA 損傷の程度に違いがみられるか否かを調べる。最後に、当該パスイエイに対し、siRNA によるノックダウン実験を行ない、CNT 曝露により中皮細胞で生じた DNA 損傷が助長されるか否かを観察することで、その關与を明らかかなものとする。また、それに先立って、肺サーファクタントによるコーティングと分散法についてあらためて検討を行う。更に、新しい試みとして、核内において、ゲノム DNA にカーボンナノチューブが巻き込まれるという仮説の証明に着目し、曝露後の細胞より抽出した DNA を試料として、CNT に結合するタンパク質の解析などから、その直接的な影響の可能性について検証を試みる。

3. 研究の方法

CNT 曝露による DNA 損傷修復酵素の網羅的な発現変動解析

曝露に用いる CNT は、SES 社製 (25nm 以下及び 100nm 以下) の SWCNT、MWCNT を用い、これまでは擬似肺胞液中で超音波槽及び超音波発振子を組み合わせる方法で、分散を行ってきた。今回の研究では、CNT が細胞に取り込まれ易い条件を検討し、分散媒の違いによる DNA 損傷作用及び変異原性の程度について見直しを行なう。具体的には、市販のウシ由来肺サーファクタントやヒト用人工肺サーファクタントを用いて、これまで用いていた擬似肺胞液との比較を行う。また、培地に添加する CNT の母液は、肺サーファクタント等との反応後に、EDTA を用いて遷移金属を十分に洗浄後、培地中に懸濁、分散させて調製する。Met-5A 細胞あるいはヒト気管支上皮由来正常細胞に対して長さの異なる CNT を 1-10mg/cm² の濃度範囲で、曝露を行い、2-12 時間後において無添加のコントロール群と共に、細胞からトータル RNA 及び核画分を調製後、qPCR アレイプレート (既知の DNA 損傷修復関連遺伝子全てを網羅したもの) を用いて、コントロール群に比べ有意な増減が認められたものを変動遺伝子の候補とし、上記 2 種類のヒト由来細胞で得られた結果を考慮して候補遺伝子を絞り、あらためて個別に定量 PCR 法を用いて、その mRNA の発現量を調べる。

CNT 曝露時における酸化ストレス応答性タンパク質の遺伝子レベルでの発現変動

CNT 曝露による DNA 損傷作用が間接的なものである場合も考慮し、Met-5A 細胞あるいはヒト気管支上皮由来正常細胞に対して長さの異なる CNT を 1-10 µg/cm² の濃度で曝露を行う。2~12 時間後において無添加のコントロールと共に、細胞からトータル RNA を調製後、qPCR アレイプレート (酸化ストレス応答に特化したもの) を用いて、コントロール群に比べ有意な増減が認められたものを変動遺伝子の候補とし、2 種類のヒト由来細胞で得られた結果を考慮して候補遺伝子を絞り、あらためて個別の定量 PCR 法により、その mRNA の発現量を調べる。次いで、胸膜中皮細胞及びヒト気管支上皮由来正常細胞中への CNT 曝露で見出された遺伝子に相当する酸化ストレス応答性タンパク質の発現に変化が起こるか否かを、ウエスタンブロット法により比較解析する。また、その変化が取り込まれた CNT に混入する金属に依存したものであるか否かを明らかにするため、キレート剤などを用いて検討する。

CNT 曝露時に胸膜中皮細胞内で発現が増大するタンパク質の解析

胸膜中皮細胞においては、癌化による急激な増殖に伴い、メソセリンの合成、細胞外への放出が活発化することが予想されている。CNT の曝露で、胸膜中皮細胞において、その逸脱が増大し、CNT の胸膜中皮細胞内の蓄積に付随して、その生合成が活発化され続けるなら、メソセリンは、CNT の曝露指標となる。即ち、メソセリンが中皮腫のマーカーとして早期発見に寄与する可能性を評価する事が出来る。MeT-5A を用いた検討として、各種 CNT を培地に添加して曝露した後、得られた培養培地中のメソセリンを、免疫沈降させ、ウエスタンブロット法により検出する。また、定量的には、ELISA 法を用い、その経時的な変動を明らかにする。特に、細胞内の変化が CNT の蓄積に相関して持続し続けるかどうかという点については、その発現に関わる遺伝子の解析も同時に進め、詳細化を試みる。

4. 研究成果

23 年度における研究では、カーボンナノチューブを擬似肺胞内液でコーティング後分散して細胞に添加し、あらためてコメットアッセイを行ない、DNA in tail (%) を求めた。データ解析の結果、SWCNT 及び MWCNT 曝露において有意な DNA 損傷が認められ、再現性が得られた。更に、塩基除去修復酵素の発現変動についてもミトコンドリア画分も含めて再解析することで、CNT 曝露による酸化的 DNA 損傷の可能性について検討した。その結果、従来指摘されたようなグリコシラーゼ等の変化は見られなかった。しかし、核内に蓄積した間接証拠として、細胞より抽出した CNT にヒストン H3 が特異的に吸着している事が明らかとなった。この結果は CNT が核内に取り込まれ、更には DNA と相互作用

用する可能性を示唆するものである。

次いで、過酸化脂質修飾 DNA 等の付加体の解析を行う前段階として、MeT-5A 細胞を用いて脂質過酸化物質及びアルデヒドの生成について調べた。その結果、曝露後細胞より抽出した試料において、TBA 値の有意な増加と SOD 活性の低下が見出された。この結果から、過酸化脂質修飾 DNA 付加体の生成の可能性が推定された。

24 年度は、CNT 曝露による細胞増殖抑制及び変異原性の機序を解明すべく、研究を進めた。これまでの先行研究で示唆される G6PDH と Catalase の活性及びグルタチオンレベルの変化について調べたところ、有意な変化は認められなかった。しかし、本検討では、曝露時間が従来の報告よりも短いため、より長い時間の曝露を行うと共に、24 時間後のみの測定ではなく、経時的な変化を調べる事が必要であると思われた。一方、細胞膜脂質の酸化を調べるために行った TBA 試験では、SWCNT 曝露の結果において、有意な差が見られ、脂質過酸化の亢進が示唆された。TBA 試験によって SWCNT 曝露における膜脂質の過酸化が見られたことから、体内で発生する主要な活性酸素種のスーパーオキシドを消去し得る、主要な酵素である SOD の活性がどのような影響を受けるかという点に注目した。曝露濃度と分散媒の組合せを変えて検討した結果、100 μ g/ml での CNT 曝露において、SOD 活性は有意に減少するという結果が、再現性良く得られた。従って、SOD 活性が低下することにより細胞内での過酸化が進み、膜の脂質過酸化と共に細胞増殖が抑制されている可能性が考えられた。

予定していた CNT 曝露による細胞内 DNA アダクトーム解析には着手できず、試料調製法や分離条件のプロトコールを作成したに留まった。この時点で、進捗が大幅に遅れる事が予想されたため、別な角度から CNT を曝露した中皮細胞内で起こる変化を解析した。MeT-5A 細胞を用いて脂質過酸化物質及びアルデヒドの生成について調べたところ、曝露後細胞より抽出した試料において、TBA-RS 値の有意な増加が見出されたことから、DNA アルデヒド付加体の生成の可能性が推定された。曝露後細胞より抽出した CNT に曝露後細胞より抽出した CNT に結合しているタンパク質について解析した結果、多くのヒストンが結合し、特に H3 が MWCNT に特異的に結合する事が分かった。この結果から、DNA 損傷評価についての検討において、CNT を細胞に曝露すると細胞内に取り込まれ、Histone (H3) に結合し DNA 損傷を引き起こしていることが示唆された。また、網羅的解析の結果、DNA 修復酵素のなかで、XRCC-1 が SWCNT 曝露において mRNA レベルで有意に上昇することを見出した。また、MWCNT においても、曝露後に有意な mRNA の増大が認められた。この事から曝露誤の早い時点で、何らかの DNA 損傷修復系

が活性化していることが予想された。

25 年度は、カーボンナノチューブ(CNT)の取り込み及び DNA 損傷作用について更に調べるため、DNA 損傷修復酵素の発現変動を詳細かすると共に、CNT 曝露による中皮腫マーカー候補蛋白質の発現変動についても解析した。XRCC-1 では蛋白質レベルで単層 CNT 曝露 2 時間後に、mRNA レベルで 1~2 時間後において有意な上昇を認めた。MWCNT においても、曝露 1 時間後に有意に mRNA が増大している事が示された。中皮腫マーカーとして、培地中へのタンパク質の分泌を評価したところ、メソテリンでは有意な変化は見られなかったが、Fibulin-3 の有意な上昇を認めた。

補完的な検討として、CNT の MeT-5A への曝露によって見出された変化が、それ自体によるものなのか、混入が指摘される鉄や銅などの遷移金属によるものであるのかを明確にする事が望まれた。そこで、遷移金属塩の曝露による細胞内脂質過酸化、抗酸化酵素の発現変動について評価、解析を行った。遷移金属の混入を想定して、混入量が最大で 5.0%になるように、鉄、コバルト、ニッケル塩をそれぞれ添加して、MeT-5A 細胞に処理した結果、脂質過酸化が若干促進される傾向が見られたのみで、その他の細胞内の成分変化及びカーボンナノチューブ曝露で認められる現象は、いずれも見られなかった。更に、DNA の酸化部位を解析するために、8-OHdG を検出し、その修飾箇所の解析を LC-MS/MS を用いて試みたが、その特定には至らなかった。

また、新たな角度からの研究アプローチとして、ナノ粒子曝露指標となる酸化ストレスマーカーの探索を行い、ナノマテリアルの曝露指標として報告される peroxiredoxin (Triboulet et al., Mol.Cell.Proteomics, 2013, Pereira et al., Nanotechnology 2013)に注目し、ヒト血液中の酸化状態について解析するため、peroxiredoxin の新規の分離検出法を考案、開発した。

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 1 件)

Ishida YI, Takikawa M, Suzuki T, Nagahama M, Ogasawara Y. Irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin 2 is caused by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells. FEBS Open Bio. 査読あり, Vol.4, 2014, 848-852, doi: 10.1016/j.fob.2014.10.003.

[学会発表](計 3 件)

瀧川まりあ、船木裕介、石田洋一、鈴木俊宏、小笠原裕樹、ヒト赤血球中還元型および酸化型 Peroxiredoxin 2 の同時分析法の開発、日本薬学会 135 年会、神戸

(2015)

松井勇太、服部研之、小笠原裕樹、石井一行、ヒト胸膜中皮由来細胞を用いたカーボンナノチューブの毒性評価、日本薬学会 134 年会、熊本(2014)

森井茜、青沼えり、野口拓巳、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サイズ酸化チタンの生体影響に関する研究日本薬学会 133 年会、横浜(2013)

〔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：

出願年月日：

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)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20231219