

氏 名	Mohiuddin
(ふりがな)	(モヒウディン)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 26 年 7 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	A Novel Genotoxicity Assay of Carbon Nanotubes Using Functional Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO)-Expressing Chicken B Lymphocytes (Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)発現ニワトリ B リンパ球細胞株を用いた 革新的なカーボンナノチューブの遺伝子毒性評価手 法の確立)
論文審査委員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 林 秀 行 教授 朝 日 通 雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

カーボンナノチューブ (CNTs) は特徴的な化学的、物理的、電氣的性質からナノマテリアルとして有用であるが、肺への沈着、肺での炎症と繊維増殖性変化、多くの細胞への強い細胞毒性等の多数の毒性評価の報告がある。我々は以前、ニワトリ B リンパ球細胞 (DT40) を用い、野生型細胞 DT40 株と DNA 修復遺伝子欠損 DT40 株への化学物質による影響を比較することで遺伝毒性を評価する手法を確立した。しかし、その方法では、野生型 DT40 はほとんどナノマテリアルを細胞内に取り込まず、ナノマテリアルの細胞毒性、

遺伝毒性を評価するのは困難であると思われた。マクロファージは粒子を細胞内へ取り込むが、その際に受容体である macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) が異物の取り込みに必要である。上記の問題を解決するために、MARCO 遺伝子を DT40 に発現させることにより多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) による遺伝子毒性を評価することを試みた。

《方 法》

MWCNTs はサイズ $7.41 \pm 2.96 \mu\text{m}$ のものを滅菌、ソニケーションし使用した。MARCO 遺伝子とトランスフェリンレセプター遺伝子をクローニングし、MARCO 遺伝子の全長を含む DNA と MARCO キメラ受容体 DNA (5' 末端に細胞内への取り込みを促進するためのトランスフェリンレセプターの遺伝子の膜貫通部分と細胞質ドメインを、3' 末端に粒子に対するレセプターである MARCO の細胞外ドメインの遺伝子をもつ) を作製した。これらの DNA は pMSCV レトロウイルスを用いて野生型 DT40 株、base excision repair 遺伝子欠損 (*FEN1* (-/-)) DT40 株と translesion DNA synthesis 遺伝子欠損 (*REV3* (-/-)) DT40 株に発現させ、発現効率は GFP 陽性細胞数により評価した。細胞の接着性の評価は、6 well のプレートに細胞をまき、1 時間後に PBS で二回洗浄したのち WST-8 を用いて生存細胞を測定することにより行った。細胞内への粒子の取り込み評価のため、粒径 200 nm のポリスチレン蛍光粒子を 24 時間細胞と共にインキュベートし蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーで観察した。酸化ストレス障害を評価するためにマウス 8-OH-dG 抗体を用いて蛍光染色を行った。DNA 障害を評価するため、 γ H2AX 抗体を用いて蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡下で目視にて γ H2AX 集積数をカウントした。DNA 障害を評価するために染色体断裂検査を行った。固定した細胞をギムザ染色しそれぞれのグループで 50 細胞の染色体断裂数をカウントし評価した。

《結 果》

野生型 DT40 はポリスチレン蛍光粒子を細胞内部に取り込まなかった。そのため

MARCO 遺伝子の全長を DT40 に発現させたが、細胞の壁面への接着性は増加するものの粒子を取り込まなかった。MARCO の機能を増強させるために、トランスフェリンレセプターの膜貫通部分と細胞質ドメインを含む MARCO キメラ受容体 DNA を作製し、最終的に MARCO キメラ受容体を野生 DT40 株、*FEN1* (-/-) DT40 株、*REV3* (-/-)-DT40 株に発現させた。

MARCO キメラ受容体を発現させた DT40 株は壁面への接着性を有し、MWCNTs を細胞内へ効率よく取り込んだ。この細胞を用い MWCNTs の毒性評価をおこなったところ、用量依存性の細胞毒性が観察された。

FEN1 (-/-) DT40 株と *REV3* (-/-) DT40 株は、野生型 DT40 株に比し MWCNTs に対して高い感受性を示した。*FEN1* (-/-) DT40 株は *REV3* (-/-) DT40 株より 8-OH-dG 陽性細胞が増加したにもかかわらず、*FEN1* (-/-) 株は *REV3* (-/-) 株より MWCNTs への感受性が低かった。さらには、*FEN1* (-/-) 株と *REV3* (-/-) 株において DNA 二本鎖切断の頻度が増え、*FEN1* (-/-) 株と *REV3* (-/-) 株は同程度の染色体断裂をきたすことがわかった。

《考 察》

野生型の DT40 株が粒子の細胞内取り込みをほとんど起こさないのに対し、我々の新しい MARCO キメラ受容体を発現させた DT40 細胞では細胞内への粒子取り込みが大きく促進した。このレトロウイルスを用いた手法により既に存在する遺伝子破壊 DT40 株に簡単に MARCO を発現させることができ、将来的にナノマテリアルのバイオアッセイに役立つと考えられた。

この手法を用いたバイオアッセイは MWCNTs が酸化ストレス障害をきたすことを示し、この結果は以前からの報告と比較し矛盾はない。MWCNTs は野生型 DT40 株に比し、*FEN1* (-/-)、*REV3* (-/-) DT40 株において酸化ストレス障害による 8-OH-dG を増加させ、そして DNA 二本鎖切断の発生を示す γ H2AX 集積と染色体断裂を増加させた。MARCO キメラ受容体発現ニワトリ B リンパ球は、MWCNTs のようなナノマテリアルに対して非常に鋭敏かつ簡便な遺伝子毒性評価方法となることが確認できた。

論文審査結果の要旨

カーボンナノチューブ (CNTs) は有用なナノマテリアルであるが、一方で、多数の有害性報告がある。過去に、ニワトリ B リンパ球細胞 (DT40) を用い、野生型細胞 DT40 株と DNA 修復遺伝子欠損 DT40 株への化学物質による影響を比較することで、化学物質の遺伝毒性を評価する手法が確立されている。しかし、この手法は、ナノマテリアルの遺伝毒性検出には、リンパ細胞へのナノマテリアル取り込みの低さが原因で応用できなかった。上記の問題を解決するために、申請者は macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) の遺伝子を DT40 に発現させることにより多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) による遺伝子毒性を評価することを試みた。MARCO はマクロファージが異物を細胞内に取り込む時に必要な受容体である。まず、MARCO を DT40 細胞に発現させたが、ナノマテリアルをほとんど細胞内部に取り込まなかった。そこで、申請者は MARCO 細胞外ドメインとトランスフェリンレセプターの膜貫通部位・細胞質ドメインとから成る MARCO キメラ受容体 DNA を作製し、それをレトロウイルスを用いて、野生 DT40 株と DNA 修復酵素遺伝子を欠損した DT40 株とに発現させた。MARCO キメラ受容体を発現させた DT40 細胞は、細胞内へナノマテリアルを効率よく取り込んだ。このバイオアッセイにより MWCNTs の酸化ストレス障害を検出できた。MWCNTs は、野生型 DT40 株に比し遺伝子修復欠損 DT40 株において酸化ストレス障害をより多く起こし、より多くの DNA 二本鎖切断を誘導した。この知見により MARCO キメラ受容体発現ニワトリ B リンパ球は、MWCNTs に対して非常に鋭敏かつ簡便な遺伝子毒性評価方法となることが確認できた。今回申請者が開発した MARCO キメラ受容体は、他のナノマテリアルに対しても将来的に広く応用できると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Archives of Toxicology 88(1): 145-160, 2014