

博士論文

紫外線照射下における銀ナノ粒子の殺菌効果と生体影響に関する研究

Study on the bactericidal and biological effects of silver nanoparticles
under ultraviolet radiation

2016年 2月

静岡県立大学大学院
薬食生命科学総合学府
環境科学専攻
博士後期課程
光環境生命科学研究室

趙 暁旭

目次

緒論	1
第1章 紫外線照射下における銀ナノ粒子の新規殺菌方法の開発	4
1-1 序論	4
1-2 実験材料及び方法	4
1-2-1 実験材料	4
1-2-2 銀粒子ストック溶液の調製	5
1-2-3 大腸菌の前培養	5
1-2-4 銀粒子作用および紫外線照射	5
1-2-5 大腸菌の生存率の測定	6
1-2-6 大腸菌内への銀粒子の取り込み量の測定	6
1-2-7 銀イオンリリース量の測定	6
1-2-8 グルタチオン量の測定	6
1-2-9 検定	7
1-3 実験結果	7
1-3-1 紫外線照射下における銀ナノ粒子による大腸菌に対する殺菌効果	7
1-3-2 銀ナノ粒子と紫外線の作用順番による大腸菌に対する殺菌効果	10
1-3-3 大腸菌への銀ナノ粒子の取り込み	10
1-3-4 紫外線による銀ナノ粒子の酸化と銀イオンリリース量の関与	13
1-3-5 銀ナノ粒子と紫外線作用後の大腸菌内グルタチオン量の変化	14
1-4 考察	16
第2章 UVA 照射下における銀ナノ粒子によるヒト培養細胞への影響	19
2-1 序論	19

2-2	実験材料および方法.....	20
2-2-1	実験材料	20
2-2-2	細胞の培養	20
2-2-3	銀粒子作用および UVA 照射	20
2-2-4	細胞の生存率の測定	20
2-2-5	ウエスタンブロット法による γ -H2AX の検出.....	21
2-2-6	免疫染色法による γ -H2AX 像の検出.....	22
2-2-7	DNA 二本鎖切断の検出.....	22
2-2-8	細胞内への銀粒子の取り込み量の測定	23
2-2-9	8-OHdG の検出	23
2-2-10	グルタチオン量の測定	23
2-2-11	活性酸素種の測定	23
2-2-12	検定	24
2-3	実験結果.....	24
2-3-1	UVA 照射下における銀ナノ粒子作用後の細胞生存率	24
2-3-2	UVA 照射下における銀ナノ粒子による DNA 二本鎖切断の生成とそれに伴う γ -H2AX の亢進.....	26
2-3-3	銀ナノ粒子の取り込み量と γ -H2AX 亢進の関与.....	28
2-3-4	DNA 損傷に対する活性酸素種の関与.....	31
2-4	考察.....	34
第3章	銀イオン存在下における UVB 照射によるヒト培養細胞への影響.....	37
3-1	序論.....	37
3-2	実験材料及び方法.....	38
3-2-1	実験材料	38
3-2-2	細胞の培養	38
3-2-3	硝酸銀作用および UVB 照射	38

3-2-4	細胞の生存率の測定	38
3-2-5	ウエスタンブロット法による γ -H2AX の検出	38
3-2-6	免疫染色法による γ -H2AX 像の検出	38
3-2-7	γ -H2AX と細胞周期の相関の解析	38
3-2-8	免疫染色法による CPDs 像の検出	39
3-2-9	ELISA による CPDs および 6-4PPs の検出	39
3-2-10	DNA に結合した銀イオン量の測定	40
3-2-11	検定	41
3-3	実験結果	41
3-3-1	銀イオン存在下における UVB 照射後の細胞生存率	41
3-3-2	銀イオン存在下における UVB 照射後の γ -H2AX の亢進と細胞周期の関与	41
3-3-3	ピリミジン二量体の生成に与える銀イオンの影響	45
3-3-4	銀イオンと DNA の結合性	47
3-4	考察	48
第4章	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とその誘導メカニズム	51
4-1	序論	51
4-2	実験材料および方法	51
4-2-1	実験材料	51
4-2-2	細胞の培養	52
4-2-3	銀粒子作用	52
4-2-4	ウエスタンブロット法による p-H3S10、G-actin および p-AURK の検出	52
4-2-5	免疫染色法による p-H3S10 および F-actin 像の検出	53
4-2-6	細胞内への銀粒子の取り込み量の測定	53
4-2-7	グルタチオン量の測定	53
4-2-8	FCM による F-actin 量の検出	53
4-2-9	Cofilin 1 ノックアウト細胞の作製	54
4-2-10	がん原遺伝子発現の検出	54

4-2-11	クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation; ChIP) 法.....	54
4-2-12	検定	57
4-3	実験結果.....	57
4-3-1	銀ナノ粒子によるヒストン H3 のリン酸化.....	57
4-3-2	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と細胞内取り込み量の関連性.....	59
4-3-3	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と銀イオンの関連性.....	61
4-3-4	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とアクチンフィラメントの関与.....	63
4-3-5	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と Aurora kinase の関与.....	67
4-3-6	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とがん原遺伝子発現制御.....	70
4-4	考察.....	72
第5章	ヒストン H3 リン酸化とフローサイトメーターの側方散乱光を指標した銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発	75
5-1	序論.....	75
5-2	実験材料および方法.....	75
5-2-1	実験材料	75
5-2-2	細胞の培養	76
5-2-3	銀粒子作用	76
5-2-4	ウェスタンブロット法による p-H3S10 の検出.....	76
5-2-5	細胞内への銀粒子の取り込み量の測定	76
5-2-6	銀粒子の取り込み量とヒストン H3 リン酸化強度の解析法.....	76
5-3	実験結果.....	76
5-3-1	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と細胞内取り込み量の相関.....	76
5-3-2	銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と銀イオンの相関.....	77
5-4	考察.....	80

総括	81
謝辞	84
参考文献	85

略語一覽

Ag⁺: silver ion

AgNO₃: silver nitrate

AgNPs: silver nanoparticles

BSA: bovine serum albumin

BSFGE: biased sinusoidal field gel electrophoresis

CBB: coomassie brilliant blue

CPDs: cyclobutane pyrimidine dimers

DCFH-DA: 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester)

dG: deoxyguanosine

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DSBs: DNA double-strand breaks

DTNB: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FBS: fetal bovine serum

FCM: flow cytometry

Fpg: formamidopyrimidine DNA glycosylase

FS: forward-scattered light

γ-H2AX: phosphorylation of histone H2AX

GR: glutathione reductase

GSH: glutathione

HPLC: high-performance liquid chromatography

ICP-AES: inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry

NADPH: nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

NER: nucleotide excision repair

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

PARP-1: poly(ADP-ribose)polymerase-1

6-4PPs: (6-4) photoproducts

ROS: reactive oxygen species

SS: side-scattered light

SSBs: DNA single-strand breaks

UV: ultraviolet rays

XPA: xeroderma pigmentosum group A protein

緒論

水は人が生命を維持するために必要であり、様々な産業活動にも不可欠の物質である。安全な水の供給は人の健康を確保するために重要であり、そのための水の殺菌技術は日々進歩している。紫外線 (Ultraviolet rays: UV) による殺菌は、全ての水性病原体に対して有効であり、UV を使用した消毒技術は、水処理の分野で進められている [1]。例えば、SODIS (Solar water disinfection) と呼ばれる太陽光 UV による殺菌工程はスイスの研究機関により広く研究され、少量の水の処理には利用可能であることが証明されている [2]。UV はその波長によって UVA (320 – 400 nm)、UVB (280 – 320 nm)、UVC (280 nm 以下) に分けられる [3]。波長の長い UVA は透過率が高いが殺菌効果は低く、波長の短い UVB と UVC は殺菌効果は高いが透過率が低いいため深部での殺菌効率に問題がある。従って、近年 UV の殺菌効率を向上させることが重要な課題になっている。

さて、最近になって銀の殺菌効果に多くの注目が集まっている。銀の広域な抗菌特性は、水や空気の浄化、化粧品、衣類、および多数の家庭用製品など、多方面で利用されている [4]。銀に殺菌効果があることはギリシャ・ローマの時代から知られ、アメリカの開拓時代には牛乳に銀コインを入れて殺菌したと言われている。近年では、ナノテクノロジーの発展に伴い、金属銀ナノ粒子、銀塩化粒子、 dendrimer 銀錯体、ポリマー銀ナノ粒子等の様々な形態の銀材料が開発され、これらの全ての形態の銀材料がある程度の抗菌活性を発揮することが明らかになっている [5,6]。特に、ナノサイズの銀材料は、銀バルクや銀イオン (Ag^+) では認められない付加的な抗菌力を示すことが期待されている [5]。従って、銀ナノ粒子 (Silver nanoparticles: AgNPs) は最も一般的に使用され、今後の利用に期待がかかるナノ材料の一つとなっている。一方、AgNPs は、細菌、真菌、ウイルスを効果的に不活性化することが既に示されている [6] が、その効果のメカニズムはまだ完全には理解されていない。

近年、様々なナノ粒子と UV の併用が殺菌に応用されている。二酸化チタン (TiO_2) ナノ粒子は光触媒として有名であり、水と空気浄化および複数の抗菌製品に使用されている [7]。UV 照射されたフラーレン (Fullerene: C_{60}) は大腸菌 (*Escherichia coli*: *E. coli*) に殺菌効果を示すことが報告されている [8]。照射された C_{60} は一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の形成を誘導し [9]、それが抗菌効果をもたらすと考えられている。酸化亜鉛 (Zinc oxide: ZnO) ナノ粒子では、UVA および UVB を用いて照射すると可視光を照射した場合に比べ、細菌に対する毒性が上昇することが報告されている [10]。これは、UV による ZnO 粒子の溶解が原因と考えられる [11]。銀における研究では、硝酸銀 (Silver nitrate: AgNO_3) と UV や可視光を複合作用することによって、ウイルス、細菌などの

不活性化を増強することが示されている[12-14]。これは、酵素蛋白質の中のチオール基 (SH 基) が Ag^+ と錯体を形成し蛋白質機能が失われること、また、 Ag^+ と SH 基の錯体は、UV 照射により、モノスルフィドラジカルやジスルフィドラジカルを生成することが原因と考えられている[14]。

一方、いくつかの研究において、銀粒子、特にナノサイズの粒子では、様々な種類のヒト細胞に対して、顕著な毒性が示されることが報告されている。15–150 nm サイズの AgNPs 作用は肝臓、皮膚、肺上皮、および神経細胞における細胞の生存率や増殖活性を低下させることが報告されている[15-18]。例えば、Eom ら[17]は、ヒト Jurkat T 細胞における AgNPs の影響を、酸化ストレスに関連するエンドポイントに着目し毒性試験を行った結果、AgNPs は Nrf-2 および NF- κ B シグナル伝達経路を介して p38-MAPK を活性化し、その結果、DNA 損傷、細胞周期停止およびアポトーシスを誘導することを示した。Foldbjerg ら[18]は、ヒト肺上皮細胞株 A549 における遺伝子発現に対する AgNPs および Ag^+ の効果について、マイクロアレイ解析を用いて検討した。作用 24 時間後、AgNPs はメタロチオネイン、熱ショック蛋白質およびヒストン蛋白質の発現を上昇させることから、AgNPs 特異的な細胞の応答が引き起こされていることが予想された。しかし、それらのメカニズムについてはまだ解明されていない。

我々が日常生活を送る上で UV の曝露を避けることはできない。UV 存在下、様々なナノ粒子が殺菌効果を増大する事実[7-11]は、私たちヒトの細胞にも何らかの影響を表す可能性が考えられる。さらに、より高い殺菌効果が期待されている AgNPs は、UV 照射下、より顕著な影響をヒトに与える可能性が考えられる。これまでに、AgNPs または UV 単独の生体影響に焦点をおいた研究は数多くなされてきたが、それら複合作用に関する研究報告はごく僅かである。実際の生活環境を考慮すると、複合作用による生体影響を解明することは重要な課題であると考えられる。

近年の研究によると、AgNPs は主に酸化型 DNA 損傷を引き起こすことが判明している[19,20]。また、UVA は代表的な酸化型 DNA 損傷である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を誘導することが報告されている[21]。UVB、UVC は直接 DNA 塩基に吸収され、DNA 塩基を励起し、それらが基底状態に戻る際に、cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) や (6-4) photoproducts (6-4PPs) を形成する[22]。AgNPs と UV がそれぞれ、DNA 損傷を引き起こすということは、それらの複合曝露によって、より重篤な DNA 損傷が生成される可能性が高い。さらに、これらの損傷は、転写や DNA 複製という細胞機能を維持するために重要な DNA 代謝反応の傷害となり、細胞死や突然変異の原因となる[21,22]。よって、DNA 損傷を評価することは AgNPs と UV のヒトへの複合影響を検討する上で重要である。

近年、クロマチン構造の変化と DNA 損傷生成、修復に密接な関係があることが報告されている[23-25]。中でも、ヒストン蛋白質の様々な化学修飾は、クロマチン構造の変化に関わっている[26,27]。例えば、ヒストンがアセチル化されると、クロマチン構造が緩み、露出した DNA を増加することが報告されている[26]。そこに、UV を照射した場合、DNA 損傷生成率が変化することが予想される。また、ヘテロクロマチン(凝集状態)中に形成された DNA 二本鎖切断 (Double-strand breaks: DSBs)、CPDs および 6-4PPs 等の DNA 損傷は、ユークロマチン(弛緩状態)中より、修復しにくいことが報告されている[23,24]。これらのことから、ヒストン修飾の変化は AgNPs と UV による DNA 損傷生成、修復に強く関連していることが予想される。従って、DNA 損傷の評価において、ヒストン修飾の変化も考慮すべきである。

本研究では、UV 照射と AgNPs による効果的な新規殺菌方法を検討すると共に、そのヒト培養細胞への影響を検討した。第 1 章では AgNPs と UV の複合作用による殺菌効果を、*E. coli* を用いて検討した。第 2 および 3 章では、AgNPs と UV の複合曝露後の DNA 損傷の生成、第 4 章では AgNPs 曝露後の DNA 損傷生成、修復に関連するヒストン修飾の変化について、ヒト培養細胞を用いて検討した。さらに、第 2、3 および 4 章の結果から、AgNPs のヒトへの影響評価が重要であることが強く示されたため、第 5 章では、AgNPs によるヒストン修飾変化を利用して、AgNPs の影響を評価する簡易スクリーニング系の構築を試みた。

第1章 紫外線照射下における銀ナノ粒子の新規殺菌方法の開発

1-1 序論

近年、AgNPsの殺菌特性に着目した製品が著しく増加している[4]。粒子径が100 nm以下のナノ粒子は、そのサイズがとても小さいので、より生物深部へと浸透しやすく、また、粒子一つの粒子径が減少することに伴い、同質量における総表面積が増加するため、マイクロサイズ粒子に比べ顕著な、そして新しい特性を示す可能性を有している。Choiら[28]は、硝化細菌および*E. coli*を用いてAgNPs、Ag⁺および銀コロイドの殺菌能力を調べた。AgNPsはAg⁺および銀コロイド比べ、約2倍の殺菌活性を持っていることを明らかにした。また、62 nmより9.2 nmサイズのAgNPsの方がはるかに高い殺菌活性を有することが報告されており[29]、より小さいサイズの方が顕著な殺菌効果があることが考えられる。さらに、AgNPsの中では、三角形および棒状より球状の方がより殺菌活性を持っていることが報告され[30]、粒子径に加え、形状も抗菌活性を左右する因子とされている。

最近の研究によって、AgNO₃とUVや可視光を複合作用させることにより、より高い殺菌効果を得ようとする試みがなされている[12-14]。Butkusら[13]は、飲料水の消毒のために、Coliphage MS-2を含む飲料水を用いて、AgNO₃とUVCの複合作用時の殺菌効果について実験を行った。その結果、効果的な殺菌効果が示され、また、水の濁度、pH等の性質は影響を受けず、運転と管理コストが低いことから、飲料水の消毒の新しい技術の一つとして提唱した。Kimら[14]は、AgNO₃とUVAや可視光の複合作用によって、*E. coli*およびColiphage MS-2に対する殺菌効果が増強されたことを報告し、そのメカニズムとして細胞内Ag⁺とSH基の相互反応を提案している。これらの研究ではAgNO₃を用いているが、AgNPsとUVの複合曝露の方が、より顕著な殺菌効果があることがAgNPs単独の実験報告から予想される。しかし、AgNPsとUVの複合曝露時の殺菌効果についての研究は報告されていない。

そこで本章では、*E. coli*を用いて、AgNPsとUVの複合曝露による殺菌効果について検討した。また、*E. coli*内へのAgNPsの取り込み量の変化、およびAgNPsから放出されたAg⁺量を測定し、殺菌効果亢進のメカニズムについて解析した。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 実験材料

E. coli (NBRC3972) は National Institute of Technology and Evaluation (Japan) から購入した。サイズ: <0.1 μm、2–3.5 μm、5–8 μm および <45 μm の銀粒子は Sigma-Aldrich

(MO, USA) から、 $<1\ \mu\text{m}$ および $<106\ \mu\text{m}$ は Wako Pure Chemicals Ind. (Japan) から購入した。波長: 320 – 390 nm (Peak: 352 nm) および波長: 350 – 400 nm (Peak: 369 nm) の UV チューブは Hitachi Ltd. (Japan) から、波長: 280 – 320 nm (Peak: 310 nm) および波長: 305 – 325 nm (Peak: 315 nm) のは Koninklijke Philips Electronics N.V. (Netherland) から購入した。

1-2-2 銀粒子ストック溶液の調製

使用直前に 1.5 mL マイクロチューブ中で、銀粒子が 30 mg/mL の濃度になるように、蒸留水に懸濁させた。その後、マイクロチューブを密閉式超音波破碎機 (Cosmo Bio, Japan) を用いて 1 分間、超音波処理した。懸濁液中の銀粒子の平均直径 (二次粒径) は、ゼータサイザーナノ (Malvern Ins., U.K.) により計測した。 $<0.1\ \mu\text{m}$ の銀粒子 (AgNPs) は 425.9 nm だった。 $>2 - 3.5\ \mu\text{m}$ の銀粒子は、ゼータサイザーナノにより計測できないので検討しなかった。

UVA 照射された銀粒子を調製するため、AgNPs ($<0.1\ \mu\text{m}$) は 3 mL 蒸留水を含む 35 mm dish (Corning, MA, USA) に懸濁し (1 mg/mL)、0 – 50 kJ/m² の UV を照射した。また、H₂O₂ で酸化された AgNPs を調製するため、1.5 mL マイクロチューブの中で、AgNPs (1 mg/mL) と H₂O₂ (1 M) を 1 時間反応した。その後、それぞれ処理した AgNPs は蒸留水で 3 回洗浄し、30 mg/mL のストック濃度で蒸留水に再懸濁した。

AgNO₃ ストック溶液は蒸留水で 10 mg/mL となるように調製し、使用直前まで -20°C で保存した。

1-2-3 大腸菌の前培養

E. coli は、グリセロールストック法によって -80°C で凍結保存されている。実験前日、凍結した *E. coli* を氷上に置いて、凍ったままスパチュラの先でかき取り、30 mL LB 培地 (Bacto Trypton 10 g, Bacto Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, 5N NaOH 0.2 mL を蒸留水 1 L に溶解し、オートクレーブで滅菌したもの) を含む 50 mL チューブに懸濁させ、18 時間前培養した。

1-2-4 銀粒子作用および紫外線照射

実験当日、前培養した *E. coli* (O.D₆₀₀ = 1) は 3 mL PBS を含む滅菌した 35 mm dish に懸濁した。*E. coli* は暗室の中で室温で穏やかに振盪しながら、銀粒子 (サイズ依存性の実験以外には、 $<0.1\ \mu\text{m}$ ($<100\ \text{nm}$) サイズの AgNPs を使用した) (0.1 – 1 mg/mL)、AgNO₃ (0.5 – 50 μg/mL) を 1 – 4 時間で作用、および UV を 8 – 50 kJ/m² 照射した。また、UV の照射線量は検出器 (Atto, Japan) を用いて同時に測定した。検出器をサンプル

ルと同じ距離に設置し、1 時間毎の照射量を 50 kJ/m² とするために、サンプルと UV チューブの間の距離を調整した。

SH 基を有する *N*-acetylcysteine (NAC) を用いた実験では、*E. coli* は暗室の中、室温で穏やかに振盪しながら、NAC (10⁻⁷ – 10⁻³ M) を 0.5 時間前作用させた。

1-2-5 大腸菌の生存率の測定

銀粒子と UV 作用後の大腸菌の生存率は、コロニー形成法によって決定した。銀粒子と UV で処理された *E. coli* を LB 培地に再懸濁し (300 倍希釈)、暗所に 37°C で 18 時間好氣的に再培養した。再培養した *E. coli* の段階希釈液 (100 μl) は、LB プレート (LB 培地に Bacto Agar (Becton Dickinson, MD, USA) を 1.5% (w/w) となるように加えたもの) に撒いて、37°C で培養した。24 時間後に形成されたコロニー数を計測し、生存率を決定した。生存率は Colony Forming Unit (CFU)/mL で表し、以下の計算式に基づいて計算した。

$$\text{生存率 (CFU/mL)} = \text{コロニー数} \times \text{段階希釈倍数/mL}$$

1-2-6 大腸菌内への銀粒子の取り込み量の測定

AgNPs、UVA 照射および H₂O₂ により酸化された銀粒子を *E. coli* に 4 時間作用した。処理後、*E. coli* を回収し、PBS で 3 回洗浄した。粒子の細胞内取り込み量は flow cytometry (FCM) (FACS CANT™ II: Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて解析した。FCM では、前方散乱光 (forward-scatter light: FS) と側方散乱光 (side-scatter light: SS) で、細胞の大きさおよび密度を解析することが可能であり、FS および SS の値はそれぞれ、“細胞の大きさ”と“細胞の密度”を反映している。取り込まれた粒子が多いほど SS の値が高くなることが明らかとなっている[31]。

1-2-7 銀イオンリリース量の測定

AgNPs の表面から放出された Ag⁺ の濃度を inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian 730ES) を用いて分析した。AgNPs、UVA 照射および H₂O₂ 処理された AgNPs (500 μL; 1 mg/mL) の水懸濁液を透析チューブ (GE Healthcare, NJ, USA) に加え、室温で 0.5 – 96 時間、10 mL の蒸留水の中に攪拌しながら透析した。また AgNO₃ (100 μM) 標準液を蒸留水で段階的に希釈し、25, 12.5, 6.25, 3.125 μM および 0 μM の AgNO₃ 標準液を調製した。Ag⁺ の放出量は AgNO₃ 標準液で作製した検量線を用いて計算した。

1-2-8 グルタチオン量の測定

GR (glutathione reductase) – DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) リサイクル法 (GSH assay) による試験管内および *E. coli* 内のグルタチオン (Glutathione: GSH) 量を測定した。

試験管の場合、AgNPs、UVA 照射および H₂O₂ 処理された AgNPs (1 mg/mL) を穏やかに振盪しながら 25°C で 24 時間インキュベーションした。遠心分離後、15 μL の上澄みと 15 μL の GSH (最終濃度 0 – 100 μM) を混合し、室温で 0.5 時間反応した。反応後、30 μL の反応混合物を試料とした。

E. coli の場合、*E. coli* は AgNPs と UVA 作用 24 時間後に回収し、GSH assay および Protein assay で使用するために二つに分けた。GSH assay のために、*E. coli* を 300 μL の 10% 5-sulfasalicylic acid (SSA) 溶液に懸濁し、室温で 10 分間に静置した。サンプルを遠心分離後、30 μL の上澄みを試料とした。

上述した 30 μL の試料は、118 μL の NADPH 溶液 (0.4 mM) および 10 μL の GR 溶液 (4 units/mL) と混合し、37°C で 1 時間インキュベータした。その後、50 μL の DTNB 溶液 (1 mM) を添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Tek, VT, USA) を用いて 412 nm で吸光度を測定した。また、15 μL の GSH (1 mM) 標準液と 585 μL の SSA 溶液を混合し、さらに混合試料を SSA 溶液で段階的に希釈し、25, 12.5, 6.25, 3.125 μM および 0 μM の GSH 標準液を調製し、上記アッセイの検量線を作成した。

Protein assay のために、*E. coli* を 100 μL Lysis Buffer 溶液 (100 mM Tris (pH8.0)、50 mM EDTA、0.5% TritonX-100) に懸濁し、1 分間で超音波処理した。氷上に約 2 時間静置した後、サンプルを遠心分離し、4 μL の上澄みを試料として、Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Labo., CA, USA) を用いてタンパク定量を行った。*E. coli* 内の GSH 含量は GSH 標準曲線を用いて計算され、protein assay の結果に基づいて補正した。

1-2-9 検定

全ての実験は、3–4 回繰り返す、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している (n=2–5)。有意差検定は Dunnett's t test を用いて一元配置 ANOVA により行った。統計的な有意性は、**P*<0.01 で表した。

1-3 実験結果

1-3-1 紫外線照射下における銀ナノ粒子による大腸菌に対する殺菌効果

E. coli に AgNPs を 4 時間作用した後、UVA チューブ (Peak: 352 nm) を用いて照射した。Fig. 1 に生存率を示す。UVA の単独作用では、*E. coli* の殺菌効果は観察されなかった。AgNPs 単独作用では、作用濃度依存的に低下したが、増殖能力を完全に抑制

するには至らなかった。UVA 照射下での AgNPs 作用では、AgNPs の作用濃度依存的に顕著な殺菌効果が観察された (Fig. 1A)。この顕著な殺菌効果は UVA の照射量 (Fig. 1B) および照射前の AgNPs の作用時間 (Fig. 1C) に依存した。また、AgNO₃ に比べて、AgNPs は顕著な殺菌効果を示し (Fig. 1D)、さらに、銀粒子の粒径が小さいほど殺菌効果は顕著であった (Fig. 1E)。

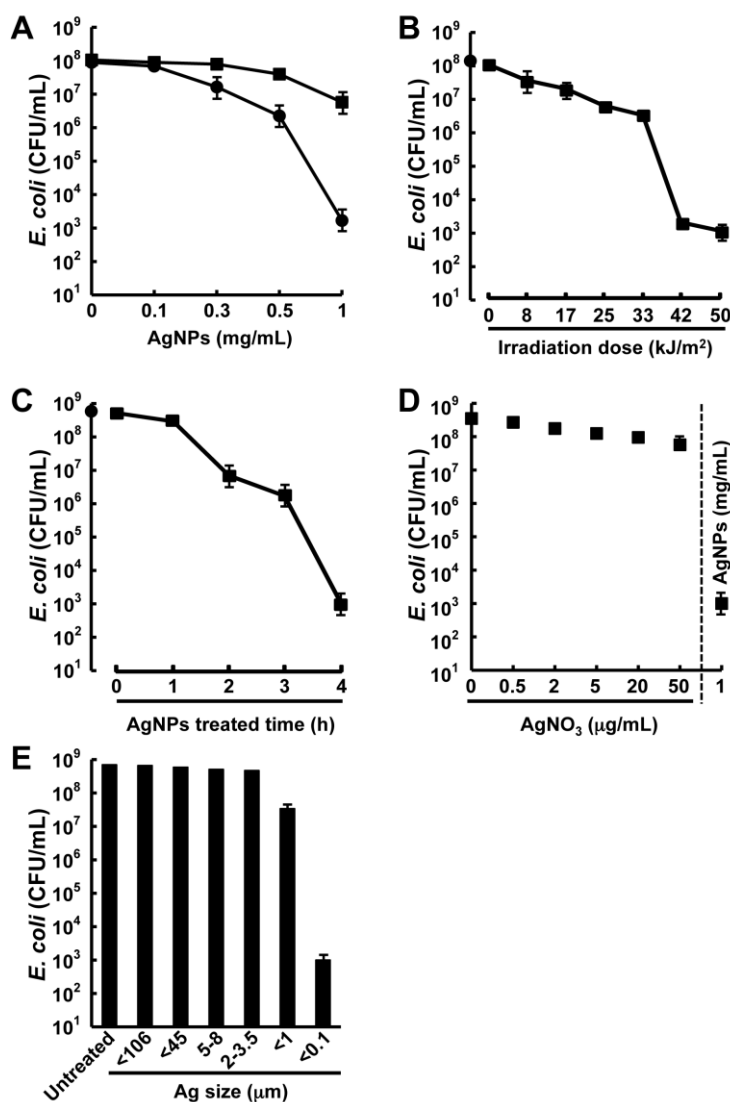


Figure 1. Remarkable bactericidal activity of concomitant treatment with AgNPs and UVA

- (A) *E. coli* treated with AgNPs for 4 h was exposed to 50 kJ/m² of UVA (peak: 352 nm). The survival was determined by colony formation assay and described as CFU/mL. ■: treated with only AgNPs; ●: treated with both AgNPs and UVA.
- (B) *E. coli* treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h was exposed to several doses of UVA (peak: 352 nm). ●: untreated; ■: treated with both AgNPs and UVA.
- (C) *E. coli* treated with AgNPs (1 mg/mL) for several hours was exposed to 50 kJ/m² of UVA (peak: 352 nm). ●: untreated; ■: treated with both AgNPs and UVA.
- (D) The bactericidal effect of AgNPs (1 mg/mL) was compared with that of AgNO₃ under the same conditions of UVA (peak: 352 nm).
- (E) *E. coli* treated with several sized Ag particles (1 mg/mL) for 4 h was exposed to 50 kJ/m² of UVA (peak: 352 nm).

異なる波長の紫外線における殺菌効果の変化を Fig. 2 に示す。各紫外線の波長スペクトルをグラフ内図にそれぞれ示している。UVA (Peak: 352 nm および Peak: 369 nm) (Fig. 2A and B) と比較して、UVB (Peak: 310 nm および Peak: 315 nm) (Fig. 2C and D) では、顕著な殺菌効果が認められなかった。

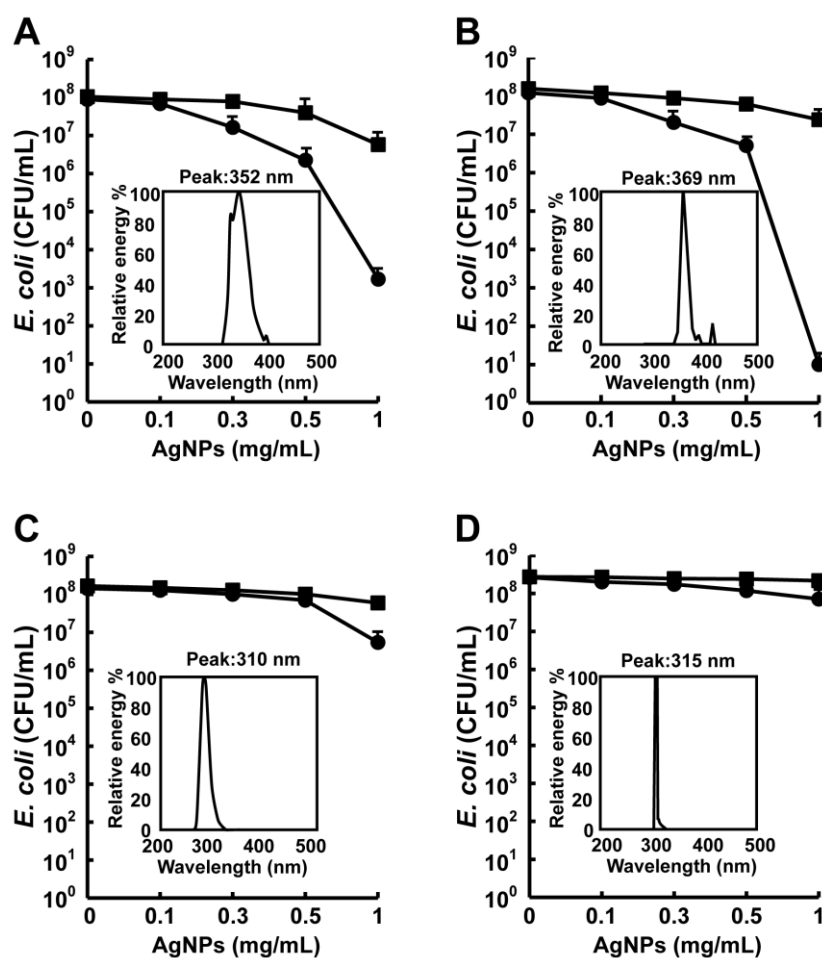


Figure 2. Contribution of UV wavelengths to the significant antibacterial effect after concomitant exposure to AgNPs and UV

E. coli treated with AgNPs for 4 h was exposed to 50 kJ/m² of UV. The wavelength characteristics of UVA (the peak is 352 nm (A) and 369 nm (B)) and UVB (the peak is 310 nm (C) and 315 nm (D)) were placed in the figures. Cell survival was determined by colony formation assay and described as CFU/mL. ■: treated with only AgNPs; ●: treated with both AgNPs and each UV.

1-3-2 銀ナノ粒子と紫外線の作用順番による大腸菌に対する殺菌効果

AgNPs を最初に *E. coli* に作用した後、UVA を作用した (Ag-UV)、および AgNPs 自体に UVA を照射して、それを *E. coli* に作用した順番 (Ag+UV) では顕著な殺菌効果が観察されたが、UVA を最初に *E. coli* に照射した後、AgNPs を作用した順番 (UV-Ag) では効果が認められなかった (Fig. 3A)。また、Ag+UV の殺菌効果は UVA 照射量に依存した (Fig. 3B)。このことから、AgNPs の表面が UVA で酸化されることが、効果的な殺菌に寄与しているのではないかと考えられた。そこで、強い酸化能力がある H_2O_2 を用いて AgNPs を前処理し、表面が酸化された AgNPs を作成した。 H_2O_2 処理をした AgNPs は H_2O_2 処理濃度依存的に顕著な殺菌効果を示した (Fig. 3C)。

以上の結果より、UVA 照射下での AgNPs 作用によって効果的に *E. coli* を殺菌できること、それには AgNPs の酸化が関連していることが明らかになった。以後の実験では、なぜ UVA 照射下における AgNPs 作用では、それぞれの単独作用よりも、顕著な殺菌効果が示されたのかを検討した。

1-3-3 大腸菌への銀ナノ粒子の取り込み

AgNPs の殺菌効果は菌体内の AgNPs の取り込み量に強く関連していることが報告されている[6,30]。そこで、UVA 照射や H_2O_2 処理によって細胞内への AgNPs の取り込み量が促進するか否かを FCM を用いて検討した。

AgNPs の作用濃度を変えて *E. coli* への取り込みを検討したところ、SS 強度が AgNPs 作用濃度依存的に上昇したことより、AgNPs は *E. coli* 内に取り込まれることが判明した (Fig. 4A)。また、小さいサイズの銀粒子ほど SS 強度の上昇が観察され (Fig. 4B)、小さいサイズの銀粒子は大腸菌内に取り込まれやすいことが示された。0.1 μm サイズ以下の AgNPs では、*E. coli* への取り込み量のはるかに多いことは、Fig. 1E で示された 0.1 μm サイズ以下の AgNPs で殺菌効果が高い事実と一致した。しかしながら、UVA および H_2O_2 で酸化された AgNPs と処理されない AgNPs は、取り込み量に変化なかった (Fig. 4C)。つまり、AgNPs 表面が酸化しても、*E. coli* 内への取り込みは上昇しなかった。

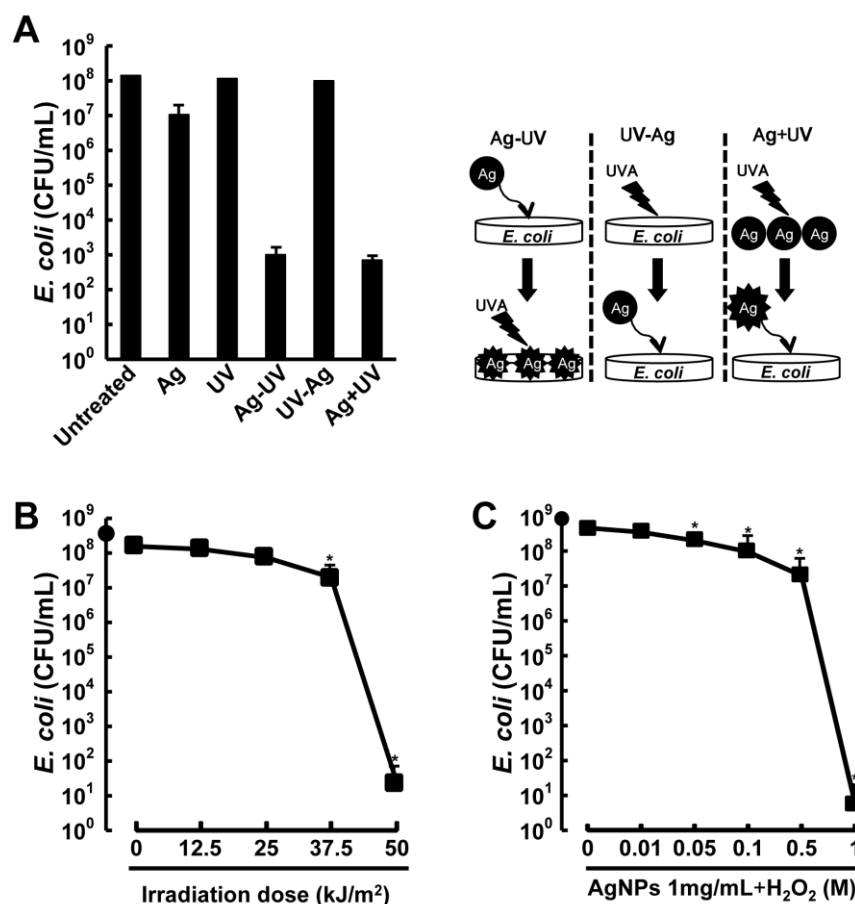


Figure 3. Oxidation of AgNPs and the relationship with antibacterial activity

- (A) The order of treatments with AgNPs and UV was changed and a colony formation assay was performed. Ag: treated with only AgNPs (1 mg/mL); UV: exposed to only UVA (the peak is 352 nm); Ag-UV: treated with AgNPs (1 mg/mL), followed by exposure to UVA; UV-Ag: exposed to UVA, followed by treatment with AgNPs; Ag+UV: treated with AgNPs (1 mg/mL) pre-exposed to UVA (peak: 352 nm).
- (B) AgNPs were exposed to several doses of UVA. The pre-exposed AgNPs were added to the *E. coli* culture dish for 4 h and a colony formation assay was performed. ●: untreated; ■: treated with AgNPs pre-exposed to UVA.
- (C) AgNPs were treated with several doses of H₂O₂ for 1 h. The oxidized AgNPs were added to the *E. coli* culture dish for 4 h and a colony formation assay was performed. ●: untreated; ■: treated with AgNPs treated with H₂O₂.

The survival data was described as CFU/mL. The statistical significance of differences between untreated AgNPs, and AgNPs exposed to UVA or treated with H₂O₂, is represented **p* < 0.01.

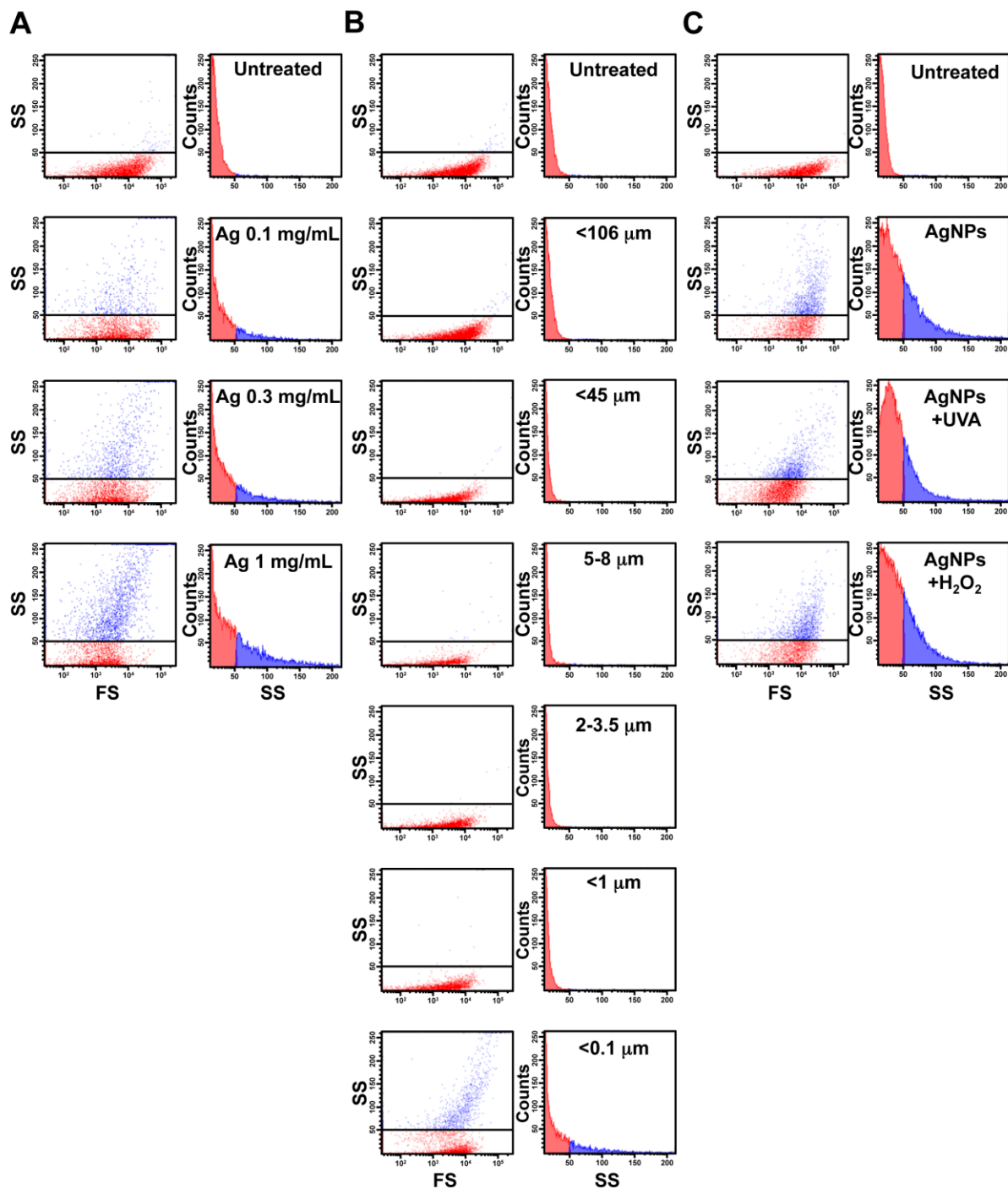


Figure 4. Incorporation of AgNPs after exposure to UVA or oxidation by H_2O_2

The incorporation of AgNPs by *E. coli* was analyzed using FS/SS in FCM.

- (A) Dose-dependent incorporation of AgNPs. *E. coli* was treated with AgNPs (0.1, 0.3 and 1 mg/mL) for 4 h and analyzed using FCM.
- (B) Incorporation of Ag particles (1 mg/mL) of different sizes for 4 h.
- (C) Incorporation of AgNPs (1 mg/mL) and AgNPs pre-exposed to UVA (50 kJ/m², peak: 352 nm) and pre-treated with 1 M H_2O_2 for 1 h.

To make the increase of SS by incorporation of AgNPs clear, a line at the highest SS intensity of untreated cells was added in each dot plot and histogram.

1-3-4 紫外線による銀ナノ粒子の酸化と銀イオンリリース量の関与

AgNPs のサイズは小さいほどより *E. coli* に取り込まれやすく、そして高い殺菌効果を示すことが明らかになった。しかし、UVA 照射は AgNPs の殺菌能力を促進させるが、細胞内への AgNPs の取り込み量は変化させないことが示された。一方、AgNPs の殺菌効果は AgNPs から放出された Ag⁺ に起因していることが報告されている [28,29]。そこで、UVA 照射による AgNPs の殺菌効果の亢進は、AgNPs から放出された Ag⁺ 量の促進に依存するのかどうかを、放出した Ag⁺ を ICP-AES で測定することにより検討した。

UVA 照射により AgNPs から水への Ag⁺ の放出は、24 時間インキュベーション後に、約 2 倍に増加し、さらに時間依存的に上昇した (Fig. 5A)。また、UV 波長による放出量の変化を検討したところ、Ag only、UVB (310 nm)、UVA (352 nm)、UVA (369 nm) 照射後、それぞれ放出量は 5、7.6、10、24 μM であった (Fig. 5B)。また、H₂O₂ 処理後は 29 μM であった。それは、Fig. 2 の殺菌効果と一致し、Ag⁺ 放出量は UVB より UVA 照射された AgNPs の方が高かった。これらの結果は、UVA 照射による AgNPs の酸化により Ag⁺ の放出量が増強されることが顕著な殺菌効果に寄与していることを示唆していた。

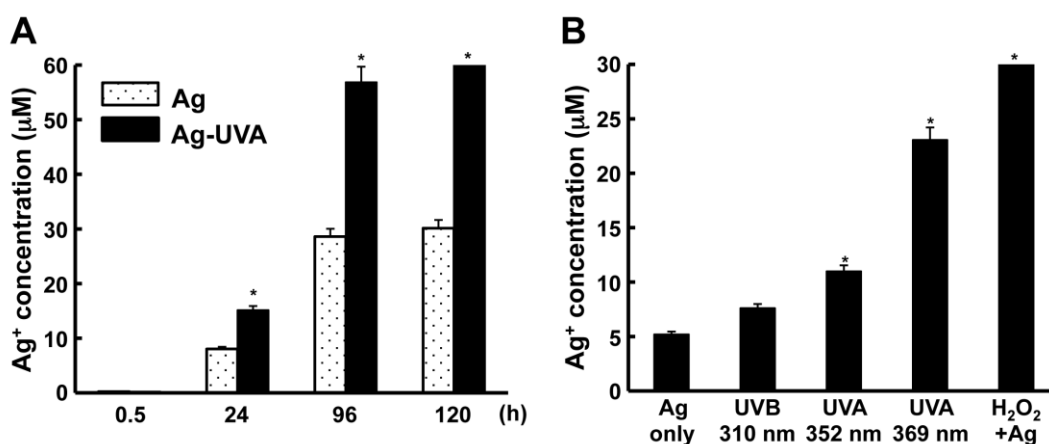


Figure 5. Determination of Ag⁺ released from AgNPs

Ag⁺ released from AgNPs was analyzed using ICP-AES. Water suspensions of AgNPs and UV- or H₂O₂-treated AgNPs (500 μL, 1 mg/mL) were dialyzed against 10 mL of water for 0.5 to 120 h at room temperature.

(A) Dialysis time-dependent release of Ag⁺. Dotted column: release of Ag⁺ from AgNPs, black column: release of Ag⁺ from AgNPs pre-exposed to UVA (50 kJ/m², the peak is 352 nm) for 1 h.

(B) UV wavelength-dependent release of Ag⁺. The release of Ag⁺ from AgNPs pre-exposed to several wavelengths of UV (50 kJ/m²) and from AgNPs pre-treated with H₂O₂ (1 M) for 1 h, was determined.

The statistical significance of differences between untreated AgNPs, and AgNPs exposed to UVA or treated with H₂O₂, is represented **p* < 0.01.

1-3-5 銀ナノ粒子と紫外線作用後の大腸菌内グルタチオン量の変化

細胞では、GSH、Cysteine、Homocysteine 等の SH 基を有する分子は、過剰な細胞内酸化の影響から細胞を保護する役割を有している。GSH は SH 基を有する生体物質の中では細胞内に最も豊富に存在する。Ag⁺は SH 基と反応し、SH 基を有する抗酸化分子の機能を阻害することが報告されている[32]。特に、AgNPs では細胞内に取り込まれる際、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が産生されるといった報告があり [33,34]、Ag⁺と反応した生体内抗酸化分子は、ROS によって誘導される酸化的な損傷を防御できないことが予想される。そこで、放出された Ag⁺が、細胞内分子、特に抗酸化物質との結合を介して、殺菌効果に寄与しているかどうかを検討した。

E. coli に NAC の存在下、UVA 照射下での AgNPs を作用させ、生存率を測定した (Fig. 6A and B)。AgNPs 作用、および酸化した AgNPs 作用による殺菌効果は、NAC によって完全に抑制された。つまり、Ag⁺が NAC の SH 基を介して結合することで、それらが細胞内 GSH 等の SH 基を有する分子と結合することが阻害される可能性が考えられた。

次に、AgNPs から放出される Ag⁺の GSH への結合を検討した (Fig. 6C)。Ag⁺と GSH が反応すると GSH assay では検出ができなくなる。GSH は AgNPs の作用により減少した。さらに、AgNPs の単独作用より UVA 照射された AgNPs の方が、より GSH の濃度が減少した。H₂O₂ 処理された AgNPs では、さらに顕著な減少が観察された。また、AgNPs 作用後の *E. coli* 内の GSH の濃度においても、AgNPs の単独作用より UVA 照射および H₂O₂ で酸化された AgNPs の方が、顕著な GSH の低下を示した (Fig. 6D)。

以上の結果は、UVA 照射下での AgNPs 作用によって、*E. coli* 内に Ag⁺の放出量が増加し、SH 基を有する細胞内分子等に結合することで機能を低下させ、その結果顕著な殺菌効果を示したことを強く示唆した。

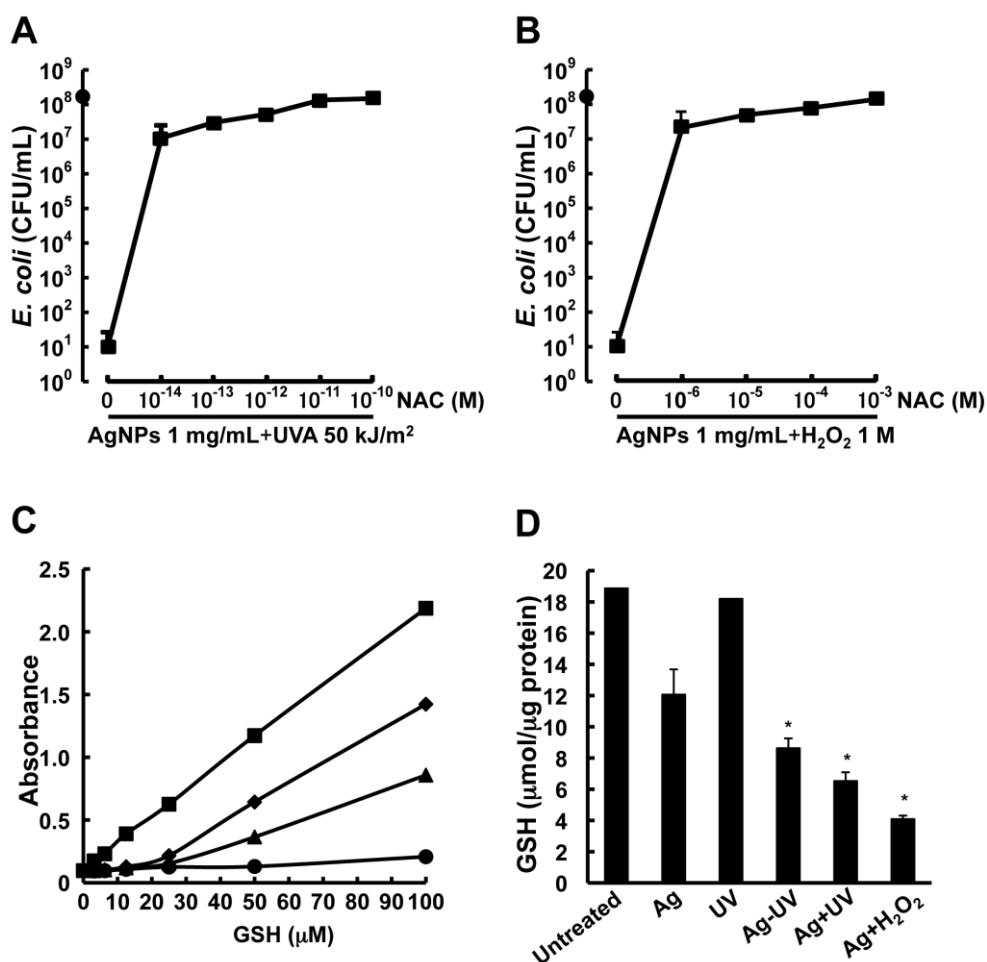


Figure 6. Reaction of Ag⁺ released from AgNPs with a molecule having a -SH group

- (A) *E. coli* was treated for 4 h with AgNPs (1 mg/mL) and exposed to 50 kJ/m² of UVA (peak: 352 nm) in the presence of NAC. Cell survival was determined by colony formation assay and described as CFU/mL. ●: untreated; ■: treated with both AgNPs and UVA.
- (B) *E. coli* was treated for 4 h with AgNPs (1 mg/mL) pre-treated with H₂O₂ (1 M) in the presence of NAC. Cell survival was determined by colony formation assay and described as CFU/mL. ●: untreated; ■: treated with AgNPs pre-treated with H₂O₂.
- (C) Amount of GSH-Ag adduct formed after the mixing of AgNPs and GSH in vitro was determined by the GSH assay. ■: GSH only; ◆: GSH+AgNPs; ▲: GSH+AgNPs pre-exposed to 50 kJ/m² of UVA (peak: 352 nm); ●: GSH+AgNPs pre-treated with H₂O₂ (1 M).
- (D) Amount of GSH-Ag adduct formed in *E. coli* after treatment with AgNPs was determined by the GSH assay. Ag: treated with only AgNPs (1 mg/mL); UV: exposed to only UVA (50 kJ/m², the peak is 352 nm); Ag-UV: treated with AgNPs (1 mg/mL), followed by exposure to UVA; Ag+UV: treated with AgNPs (1 mg/mL) pre-exposed to UVA; Ag+H₂O₂: treated with AgNPs (1 mg/mL) pre-treated with H₂O₂ (1 M). The statistical significance of differences with untreated AgNPs is represented **p* < 0.01.

1-4 考察

本章では、*E. coli* を用いて、UVA 照射下における AgNPs による殺菌効果とそのメカニズムを中心に検討した。UVA 照射下での AgNPs 作用は、顕著な殺菌効果を示し、また、AgNO₃ (Ag⁺) の殺菌効果と比較すると、AgNPs (1 mg/mL) の方が AgNO₃ (50 µg/mL、約 300 µM) よりも効果的であった。AgNPs から放出される Ag⁺の量は、ロードされた銀の総量の約 0.1%であることが報告されている[29]。それに基づけば、今回の実験では、使用した AgNPs (1 mg/mL) から約 1 µg/mL (5 µM) の Ag⁺が放出されたことになる。この濃度は使用した AgNO₃ (50 µg/mL、約 300 µM) の濃度より低かったにもかかわらず、AgNO₃ に比べ AgNPs の方が高い殺菌効果を示したことになる。よって、ナノ粒子特有の効果が顕著な殺菌機能に寄与することが考えられた。

この殺菌効果は銀粒子のサイズに依存した。Fig. 1E で使用した <0.1 µm のサイズの AgNPs は UVA 照射により高い殺菌効果を示したのに対し、これより大きい (>0.2 µm) 銀粒子はほとんど、あるいはまったく影響を与えなかった。近年、いくつかの研究では、ナノ粒子のサイズと形状は殺菌効果および細胞毒性に関連していることが報告されている[29,30]。例えば、Lok ら[29]は 10 – 100 nm サイズの AgNPs を用いて *E. coli* に対する AgNPs の毒性を検討し、それらが粒子のサイズに依存することを報告している。Fig. 4 並びに Fig. 1E において *E. coli* への AgNPs の取り込み量と殺菌効果が 0.1 µm のサイズ以下の AgNPs で上昇することが判明したので、ナノサイズ粒子ゆえに細胞内に取り込まれ、殺菌効果を示すことが示唆された。しかし、UVA 照射によっては、取り込み量は上昇しなかったことから、*E. coli* を殺傷するには 0.1 µm 以下で細胞内に取り込まれることが必須であるが、UVA により殺菌効果が上昇した理由ではないと考えられた。

Fig. 5 において、AgNPs 表面からの Ag⁺リリース量を ICP-AES を用いて調べた結果、UVA 照射によって Ag⁺のリリース量が増加することが判明した。よって Ag⁺の放出増加が顕著な殺菌効果に寄与していることが考えられた。いくつかの研究が Ag⁺に殺菌効果があることを報告している[32, 35]。興味深いことに、UVA 照射された AgNPs から放出された Ag⁺の量は Fig. 1D で使用した AgNO₃ の濃度よりかなり低かったが、AgNO₃ より AgNPs と UVA の複合作用による殺菌効果が強かった。つまり、AgNPs は *E. coli* の中に取り込まれ、UVA 照射により酸化され、細胞内で連続的に Ag⁺放出するため、殺菌効果が高かったと考えられる。

Ag⁺は NADH デヒドロゲナーゼなどの呼吸連鎖反応の酵素と相互作用し、その結果、ATP 合成から呼吸の脱共役を生じる[29]。呼吸鎖の擾乱によって、ROS 生成の可能性があり[33-36]、ROS は高い毒性を有することはよく知られている。また、Ag⁺は細胞膜を浸透し、膜蛋白質に結合することによって、プロトン駆動力の崩壊を引き起こす

[32]。本研究では、 Ag^+ と細胞内分子である GSH の反応を検討した結果 (Fig. 5)、 Ag^+ が GSH と結合することを明らかにした。また、UVA 照射により *E. coli* 内の GSH の減少が顕著であることも示した。よって、UVA 照射によって放出された Ag^+ は、細胞の機能的な蛋白質と反応し、その結果殺菌活性につながる事が考えられた。

生体内では、細胞内の H_2O_2 と AgNPs の反応は、 Ag^+ 放出量の増加を引き起こす要因の一つであると推定される[37]。また、ナノ粒子は細胞内に取り込まれた際、 H_2O_2 を始めとする ROS の生成を誘導することが報告されている[38]。さらに、 Ag^+ と SH 基を持つ GSH、Cysteine、Homocysteine などの抗酸化分子との反応は、抗酸化分子の機能を失わせ、細胞内の酸化を増加させる[34]。本研究では、 H_2O_2 で処理された AgNPs を用いて、 Ag^+ の放出量を検討した結果 (Fig. 5)、 Ag^+ の放出量が大幅に増加する結果を得た。また、 H_2O_2 で処理された AgNPs は GSH の細胞内での減少とともに、顕著な殺菌効果を示した (Fig. 3)。従って、AgNPs 作用による H_2O_2 の細胞内濃度の上昇が、AgNPs を酸化させ、 Ag^+ リリース量の増加を引き起こし、毒性の上昇に関与したことも一因として考えられる。AgNPs と UVA、さらに細胞内 H_2O_2 の複合作用が加わって、*E. coli* 内に Ag^+ の放出量が大幅に増加し、細胞内分子に結合することで機能を低下させ、その結果顕著な殺菌効果を示したことが予想された。

UVA 照射下における AgNPs によって効果的に *E. coli* を殺菌できるが、UVB では高い効果は認められなかった。これは、UVA と比較して、UVB は波長が短いために、*E. coli* 懸濁液に深く浸透することができなかつたためと考えられる。また、UVB は AgNPs の存在下で遮光されてしまう可能性がある。さらに、UVA 照射は、粒子の表面を酸化させると共に、*E. coli* の中でもヒドロキシルラジカルや H_2O_2 など、ROS を生成し、これらの ROS は侵入した粒子の表面をさらに酸化させる可能性もある。これらの理由から、UVA によって効果的な殺菌効果が可能であったと考えられる。さらに、AgNPs 単独作用では、*S. aureus*、*L. mesenteroides* や Coliphage MS-2 などに対する抗菌効果を示すことが報告されているので[6,14]、*E. coli* 以外の微生物においても、UVA 存在下での AgNPs 作用はより顕著な殺菌効果を示すことが考えられる。

第 1 章の内容を Fig. 7 にまとめた。第 1 章においては、主に UVA 照射下における AgNPs による *E. coli* に対する効果的な殺菌を実証した。高い殺菌効果を示すためには、*E. coli* 内への AgNPs の取り込みと、*E. coli* 内での持続的な Ag^+ の放出が両方必須である。さらに、放出された Ag^+ は *E. coli* の生体分子と SH 基を介して結合することで、それら分子を不活性化し、効果的な殺菌効果を示したのではないかと考えられた。私は、AgNPs と UVA の併用が、将来、空気、水および医療材料等の消毒に適用されることを期待している。

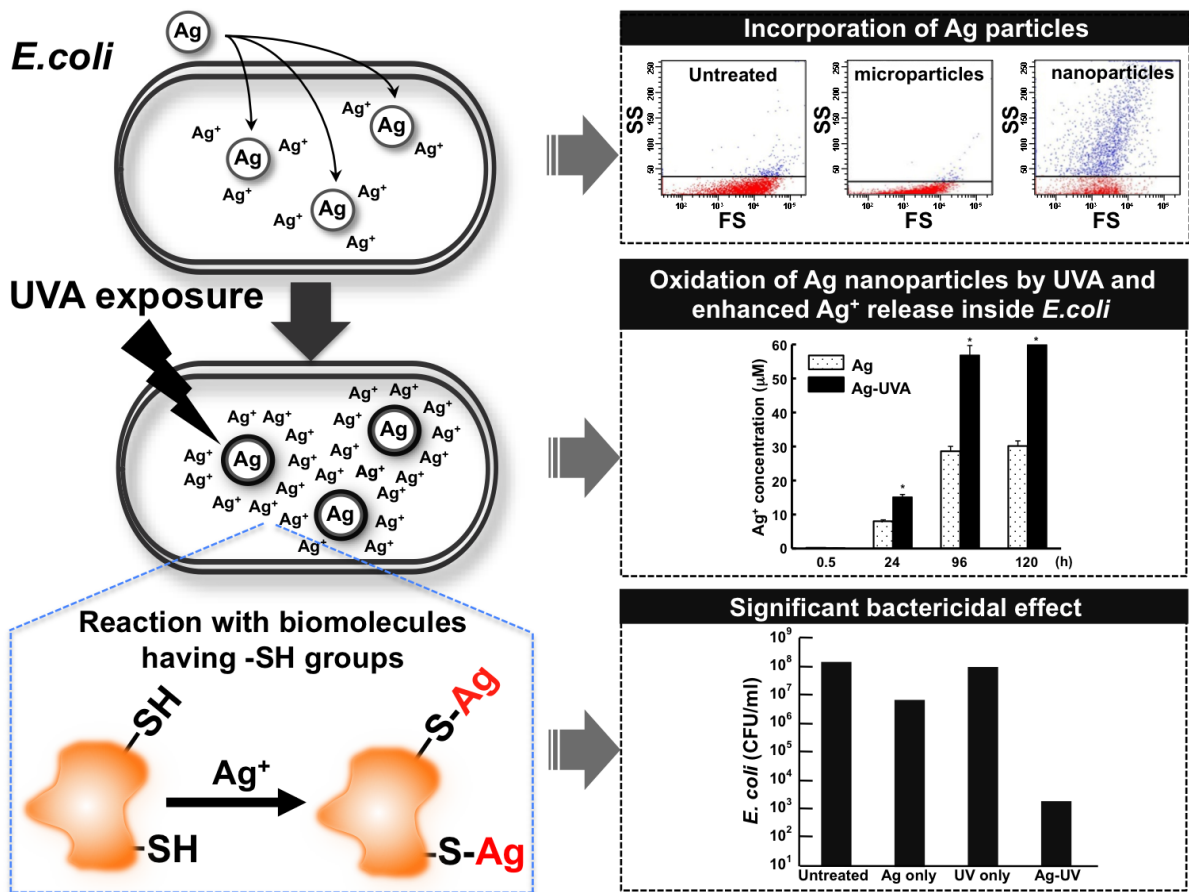


Figure 7. Incorporation of AgNPs and bactericidal effect

第2章 UVA 照射下における銀ナノ粒子によるヒト培養細胞への影響

2-1 序論

第1章においてUVA照射下におけるAgNPs作用は*E. coli*に対して顕著な殺菌効果を示すことを明らかにした。我々は、日常的にUVに曝露されている。UVA存在下、高い殺菌効果をAgNPsが示すのであれば、我々ヒトにも何らかの影響を示すことが危惧される。

UVの全太陽放射に占めるエネルギー比は約6%であり、可視光(約52%)、赤外線(約42%)に比べると量的に少ないが、その光子エネルギーが大きいため地球上の様々な生物に影響を与える。UVの主要な生体影響はDNA損傷である。UVによって生じたDNA損傷は、その後細胞内で突然変異発生の原因となり、これが老化、発がんに結びつくと考えられている[21,22]。UVはその波長によってDNAを損傷する機構が全く異なる。長い波長のUVAでは、細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(Nicotinamide adenine dinucleotide: NADH)やフラビンアデニンジヌクレオチド(Flavin adenine dinucleotide: FAD)等のUVAを吸収する色素団が存在し、これらがUVAを吸収し励起される。励起されたNADHやFADが基底状態に戻る時、ROSを細胞内に放出し、その結果、DNA損傷、蛋白質の切断や脂質の過酸化を引き起こす[21]。短い波長のUVB、UVCでは、CPDsおよび6-PPsが形成されることがよく知られており[C9]、これについては第3章に詳細に記載した。

一方、AgNPsも様々な種類のヒト細胞に対してDNA損傷を引き起こすことが報告されている[17,19,20,39,40]。Ávalosら[39]は、4種類のヒト培養細胞を用いて、AgNPs作用後のDNA損傷を検討した結果、全ての細胞株において、AgNPsの作用濃度およびサイズ依存的にDNAの切断を増加したことを示した。さらに、CHO-K1細胞においては、AgNPsを処理すると、細胞質と核内でそれらが凝集し、細胞内の酸化を誘発、酸化型DNA損傷である8-OHdGを生成することが報告されている[19]。従って、AgNPsとUVAはそれぞれDNA損傷を引き起こすことから、複合作用させれば、より重篤なDNA損傷を引き起こす可能性がある。

近年、DNA損傷評価の一つとしてヒストンH2AXセリン139番目のリン酸化(phosphorylated histone H2AX: γ -H2AX)が注目されている。DNA損傷の中で、DSBsはがんや遺伝性疾患の両方のリスクを高める突然変異につながる最も重篤なDNA損傷であると考えられている。 γ -H2AXはDSBsの生成が起因となって生成するため、電離放射線のようにDSBsが直接的に生成される因子によって誘導される[41]。一方、DNA付加体やDNAクロスリンク、DNA一本鎖切断(Single-strand breaks: SSBs)、酸化型DNA損傷およびUV誘発DNA損傷(Pyrimidine dimers)等を保有したまま細胞

が複製期に入り、DNA 複製が行われた場合に、複製フォークが上記損傷に衝突、そのストレスによって DSBs が生成、H2AX がリン酸化されることが報告されている[42]。また、DNA 損傷を修復する過程で DSBs が生じ、 γ -H2AX が誘導されることが報告されている[43]。 γ -H2AX を用いたアッセイは高感度および低偽陽性率を有するため、現在、DNA 損傷を検出するための有用な手段と考えられている[43]。

そこで本章では、UVA と AgNPs 同時曝露後のヒト細胞、特に DNA への影響を、 γ -H2AX に着目し検討した。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 実験材料

ヒト皮膚細胞 HaCaT は Dr. Norbert Fusening (German Cancer Research Center, Germany) より提供された。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 およびヒト乳癌細胞 MCF-7 は Japanese Collection of Research Bioresources (Japan) から購入した。また、第 1 章 1-2-1 に示した銀粒子 (<0.1 μm 、2–3.5 μm 、5–8 μm 、<45 μm および <106 μm) および UVA チューブ (320–390 nm (Peak: 352 nm)) を用いた。

2-2-2 細胞の培養

HaCaT、A549 および MCF-7 細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養し、80% コンフルエントとなった時継代を行った。実験に用いる細胞は 35 mm dish にまき、実験当日に dish に 80% コンフルエントの状態になるように調整した。

2-2-3 銀粒子作用および UVA 照射

細胞は実験当日に新しい 10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地に培地を交換した。実験当日は、第 1 章 1-2-2 を示したように使用直前に調製した銀粒子 (0.1–1 mg/mL) および AgNO₃ (0–50 μM) を 4 時間作用させた。PBS (+) 溶液(0.9 mM CaCl₂ · 2H₂O、0.5 mM MgCl₂ · 6H₂O となるように PBS で調製したもの) に交換し、UVA (Peak: 352nm) を 50 kJ/m² 照射した。照射後、PBS (+) 溶液を 10% FBS を含む DMEM 培地に交換した。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下、0–48 時間で培養した。また、NAC を用いた実験では、細胞に NAC (20 mM) を 0.5 時間前作用させた。

2-2-4 細胞の生存率の測定

銀粒子作用および UVA 照射した後、PBS で洗浄し、A549 および MCF-7 細胞用トリプシン (Trypsin (2.5%) 0.65 mL、EDTA (0.02%) 6.5 mL、PBS 5.85 mL) および HaCaT 細胞用トリプシン (Trypsin (2.5%) 0.2 mL、EDTA (0.02%) 5 mL、PBS 4.8 mL) 処理により細胞を回収した。回収した細胞懸濁液 100 μ L に対しトリパンブルー溶液 (PBS 100 mL、NaN₃ 65 mg、trypan blue 1 g) 100 μ L を加え、血球計算盤を用いて生細胞と死細胞の数をカウントし、その割合から生存率を計算した。

2-2-5 ウェスタンブロット法による γ -H2AX の検出

Western blotting によって γ -H2AX の検出を行った。銀粒子作用および UVA 照射した後、細胞を回収し、1 mL MS Buffer (5 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA (pH7.5)、210 mM mannitol、70 mM sucrose、1% protease inhibitor) を加え、ホモジナイザーで 10 回ストロークした後、氷上で 10 分間静置した。その後、遠心分離し上清を捨てた後、Western Blotting 用 Lysis Buffer (50 mM Tris (pH8.0)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、0.5% nonidet P-40) に懸濁し、1 分間で超音波処理した。氷上に約 2 時間静置し細胞を完全に溶解した後、Bio-Rad protein assay kit を用いてタンパク定量を行った。全サンプルのタンパク量を合わせて、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、泳動 Buffer (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 3 g、glycine 14.4 g、SDS 1 g を蒸留水 1 L にしたもの) 中で 20 mA、約 2 時間泳動し分離した。分離した蛋白質を Blotting Buffer (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.1 g、glycine 14.4 g、methanol 50 mL を蒸留水 1 L にしたもの) および Blotting 装置 (Atto, Japan) を用いて電氣的に Polyvinylidene Fluoride (PVDF) (Millipore, MA, USA) 膜に転写した。転写した後 1% skim milk で 1 時間ブロッキングした。その後、1% skim milk と 0.1% Tween 20 を含む PBS (0.1% TPBS) を等量で割った混合液によって 1/1000 に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応した後、0.1% TPBS で 3 回洗浄し、同じく 1% skim milk と 0.1% TPBS を等量で割った混合液によって 1/1000 に希釈した二次抗体を 2 時間反応させた。二次抗体反応した後、0.3% TPBS で 3 回、さらに 0.1% TPBS で 3 回洗浄した。目的タンパクのバンドは化学発光検出キット Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、ケミルミ撮影装置 (Atto, Japan) で検出した。

γ -H2AX 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-phospho-H2A.X (Ser139) (rabbit polyclonal) (Millipore, MA, USA)

二次抗体：Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

アクチン (Actin) 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-actin (C-11) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

2-2-6 免疫染色法による γ -H2AX 像の検出

免疫染色法によって γ -H2AX の検出 (フォーカスの検出) を行った。MCF-7 細胞を Micro Cover Glass ($\phi=10$ mm; Matsunami Glass, Japan) を含む 35 mm dish にまき、2-2-3 に示したように培養した。AgNPs と UVA、および H_2O_2 (5 mM) を処理した MCF-7 細胞をまいた Micro Cover Glass を 3.7% Formalin で 15 分間、固定した。PBS で 3 回洗浄し、2% TritonX-100 溶液を加え、3 分間に室温静置した。3 分間後、PBS で 3 回洗浄し、抗体希釈用溶液 (0.2% TritonX-100, 1% bovine serum albumin (BSA)) によって 1/100 に希釈した一次抗体を 2 時間反応させた。一次抗体を反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、同じく抗体希釈用溶液によって 1/100 に希釈した二次抗体を 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Propidium Iodide (PI) (20 μ g/mL) 溶液で核染色し、マウント溶液でスライドガラスに固定した。蛍光顕微鏡 (Olympus, Japan) によって γ -H2AX のフォーカスを検出した。

γ -H2AX 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-phospho-H2A.X (Ser139), clone JBW301 (mouse monoclonal) (Millipore, MA, USA)

二次抗体：Flourescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

2-2-7 DNA 二本鎖切断の検出

バイアス正弦電場ゲル電気泳動 (Biased sinusoidal field gel electrophoresis: BSFGE) (Atto, Japan) によって MCF-7 細胞における DSBs の検出を行った。処理した MCF-7 細胞をトリプシンで回収し、36 μ L の 10 mg/mL 低融点アガロース (Lonza Group Ltd., Switzerland) 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA) に懸濁し、サンプルブロック作成器を用いて、1 ブロックサイズ 10 mm \times 5 mm、厚さ 1.5 mm のサンプルゲルを作製した。サンプルゲルを 4 $^{\circ}$ C で完全に固化させた後、1.5 mL チューブに移し 0.5 mg/mL proteinase K 溶液 (1% sodium n-lauroyl sarcosinate、0.5 M EDTA (pH8.0)、10 mM Tris-HCL) を 1 mL 加え 50 $^{\circ}$ C、24 時間反応させた。反応した後、サンプルゲルを 0.8% アガロースゲル (Lonza Group Ltd., Switzerland) にアプライし電気泳動を行った。泳動は DC 電圧 30 V、AC 電圧 198 V、AC 周波数 0.001 Hz から 0.005 Hz まで直線的に変化させながら 32 時間行った。また泳動緩衝液は 0.5 \times TBE とし、緩衝液循環式熱交換器 (Atto, Japan) および循環冷却恒温装置 (Atto, Japan) を用いて泳動中、常に 20 $^{\circ}$ C を保持

した。泳動終了後、ゲルを泳動緩衝液で希釈した ethidium bromide (EtBr) (10 µg/mL) で 1 時間染色しトランスイルミネーター (Bio-Rad Labo., CA, USA) を用いて写真を撮影した。

2-2-8 細胞内への銀粒子の取り込み量の測定

実験前日 80%コンフルエントの状態になった各細胞に銀粒子 (0–1 mg/mL) を 4 時間作用させた。その後、細胞をトリプシンで回収、懸濁し、第 1 章 1-2-6 に示したように細胞内の銀粒子の取り込み量を FCM を用いて測定した。

2-2-9 8-OHdG の検出

MCF-7 細胞 (約 6×10^6 個 ; 100 mm dish 2 枚分) に AgNPs と UVA を作用させ、作用終了直後に細胞を回収し、DNA はエタノール沈殿法を用いて抽出した。抽出した DNA は最終的に水 100 µL に溶解した後、窒素を充填した 1.5 mL Tube 中に 4 °C で一晩放置した。DNA 量は 260 nm の吸収波長によって測定した (Beckman Coulter, Inc., CA, USA)。100 mm dish 2 枚分の MCF-7 細胞から約 300 µg の DNA が得られた。得られた DNA 40 µg を含む DNA 水溶液に精製水を加え 22.5 µL に調整した上で、200 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 2.5 µL と nuclease P1 4 µL (500 units/mL) を加え、窒素置換後、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後、50 mM Tris-HCL 1.5 µL (pH 7.4)、alkaline phosphatase 0.4 µL (4000 units/mL) を添加して窒素置換後、さらに 37 °C で 2 時間インキュベートし加水分解を行った。加水分解物を Ultra-free MC (Millipore, MA, USA) を用い、12000 rpm、15 分間遠心し除タンパクを行った。8-OHdG の検出には、ECD 付き HPLC (Shimadzu, Japan) を用いて行い、 10^5 個のデオキシグアニン (deoxyguanosine: dG) に対する 8-OHdG の個数を算出した。

2-2-10 グルタチオン量の測定

第 1 章 1-2-8 と同様に、細胞内 GSH 量を測定した。

2-2-11 活性酸素種の測定

細胞内 ROS 量は、細胞浸透性蛍光プローブ 6-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (DCFH-DA) を利用し測定した。DCFH-DA は細胞内に散在され、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し非蛍光型 DCFH になり、さらに ROS により素早く酸化され、強く蛍光する DCF に変化する。蛍光強度は細胞質ゾルの ROS レベルに比例する。MCF-7 細胞に 10 mM DCFH-DA を 1 µL で 30 分作用した後、AgNPs および AgNO₃ 作用した。作用した MCF-7 細胞を回収し、PBS で 3 回

洗浄した。FCM 専用チューブに PBS で 3 mL に調製したサンプルを添加した。FCM の FITC に指標として測定した。

2-2-12 検定

第 1 章 1-2-9 と同様に有意差検定を行った。統計的な有意性は、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で表した。

2-3 実験結果

2-3-1 UVA 照射下における銀ナノ粒子作用後の細胞生存率

ヒト皮膚細胞 HaCaT、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 およびヒト乳癌細胞 MCF-7、それぞれ各細胞に銀ナノ粒子を 4 時間作用した後、UVA (Peak: 352 nm) を用いて照射した。その後、トリパンブルーアッセイを用いて、培養時間依存 (Fig. 8A)、および AgNPs の作用濃度依存 (Fig. 8B) 的な細胞生存率を測定した。AgNPs および UVA それぞれの単独作用では、全ての細胞株において生存率のわずかな低下が観察された。また、UVA と AgNPs の複合作用によって、MCF-7 および A549 細胞において生存率が顕著に減少した。しかし、HaCaT 細胞では、UVA 照射下での AgNPs 作用による生存の変化は認められなかった。これらの結果は、UVA 照射下での AgNPs 作用においては、細胞株に依存的に細胞毒性が変化することを示していた。

さらに、UVA 存在下において、AgNPs と AgNO₃ (Ag⁺) 作用による生存率変化を比較した (Fig. 8C)。UVA 照射下における AgNO₃ 作用では、細胞株に関わらず、3 種全ての株において生存率の低下が引き起こされた。

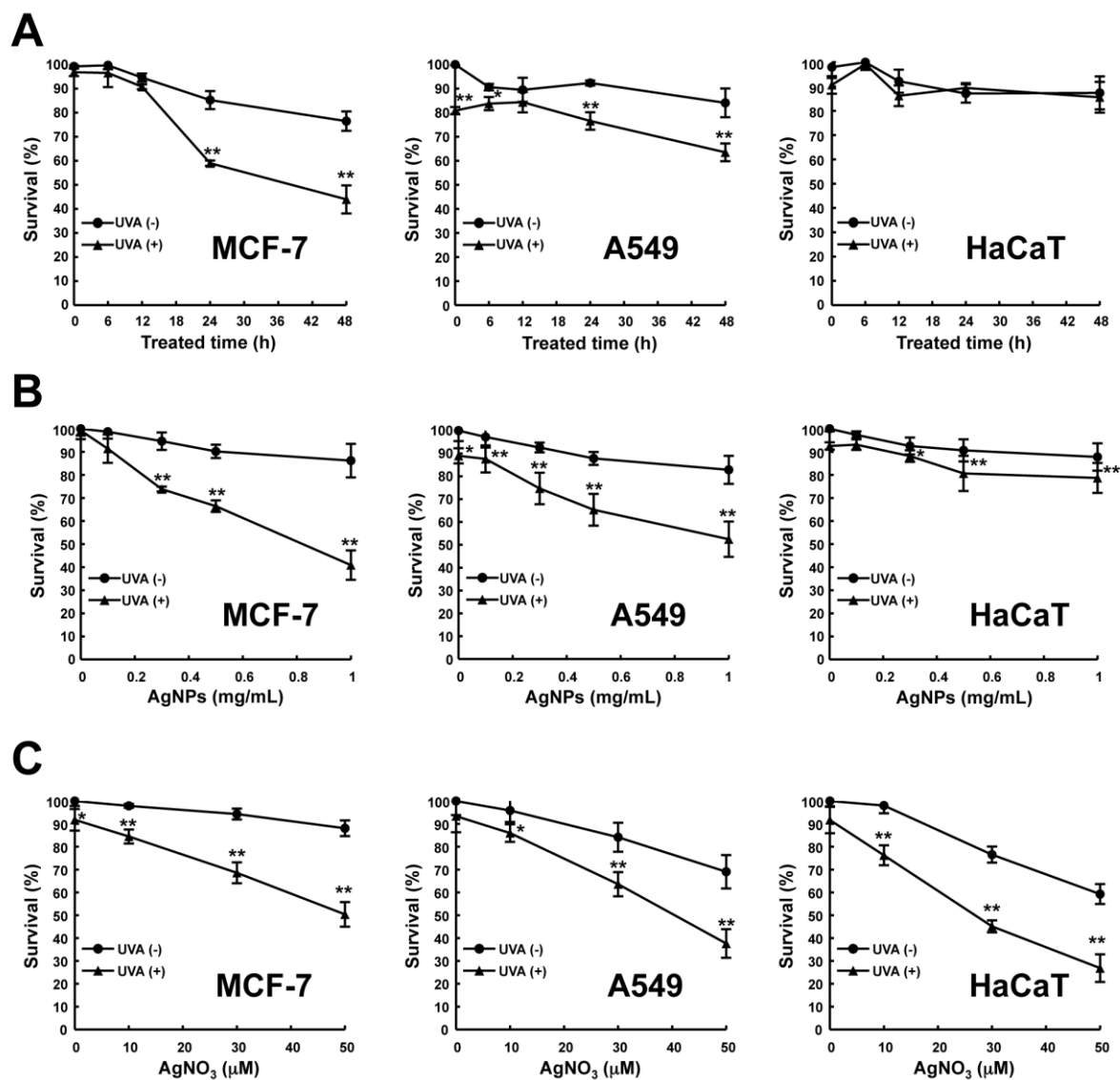


Figure 8. Cytotoxicity of combined treatment with AgNPs and UVA in three types of cell lines
Cell survival was determined after treatment with AgNPs or AgNO₃ and UVA using the Trypan blue exclusion assay.

- (A) Time-dependent survival. Cells treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h were exposed to 50 kJ/m² of UVA and cultured for the indicated time. ●: treated with only AgNPs; ▲: treated with both AgNPs and UVA.
- (B) AgNP-dose-dependent survival at 24 h. Cells treated with AgNPs for 4 h were exposed to 50 kJ/m² of UVA. ●: treated with only AgNPs; ▲: treated with both AgNPs and UVA.
- (C) AgNO₃-dose-dependent survival at 24 h. Cells treated with AgNO₃ for 4 h were exposed to 50 kJ/m² of UVA. ●: treated with only AgNO₃; ▲: treated with both AgNO₃ and UVA.
- Data represent the mean ± S.D. (n= 3). **p*< 0.05, ***p*< 0.01.

2-3-2 UVA 照射下における銀ナノ粒子による DNA 二本鎖切断の生成とそれに伴う γ -H2AX の亢進

UVA 照射下における AgNPs 作用が MCF-7 および A549 細胞に顕著な細胞毒性を示すことを明らかにした。次に、UVA 照射下での AgNPs 作用後の γ -H2AX を検討し、DNA 損傷性評価を行った (Fig. 9A)。MCF-7 細胞では、UVA、AgNPs それぞれの単独作用よりも複合作用の方が強い γ -H2AX が観察された。またそれは、照射後の培養時間および UVA の照射量に依存した (Fig. 9B and C)。A549 細胞においても同じ傾向が観察された。一方、 γ -H2AX の誘導は、HaCaT 細胞では認められなかった。

MCF-7 細胞における、AgNPs と UVA 作用後 1 時間での γ -H2AX の免疫染色像を Fig. 9B に示す。UVA 照射では γ -H2AX は認められないが、AgNPs 単独作用では γ -H2AX のフォーカスが出現した。また、UVA 照射下での AgNPs 作用により顕著な γ -H2AX のフォーカスが出現した。 γ -H2AX フォーカスの生成は、5 mM の H_2O_2 を用いた作用でも観察された。

さらに、BSFGE によって DSBs の検出を行った (Fig. 9C)。MCF-7 細胞に AgNPs を単独作用すると、AgNPs の作用濃度依存的に DSBs が増加したが、UVA 単独照射では僅かな変化しか認められなかった。一方、UVA 照射下での AgNPs 作用により、AgNPs の作用濃度に依存的により強い DSBs が観察された。これらの結果は、UVA 照射下での AgNPs 作用では、 γ -H2AX の起因になる DSBs の生成が亢進したことを示していた。Fig. 9D は、 AgNO_3 と UVA を作用した後の γ -H2AX の生成を示している。UVA 照射下における AgNO_3 作用は、 AgNO_3 の作用濃度に依存的に γ -H2AX の生成を亢進した。この亢進した γ -H2AX は、Fig. 8C における細胞死の結果と一致して、全ての細胞株において観察された。これらの結果より、AgNPs からの Ag^+ の放出が、 γ -H2AX の生成に寄与していた可能性が予想された。

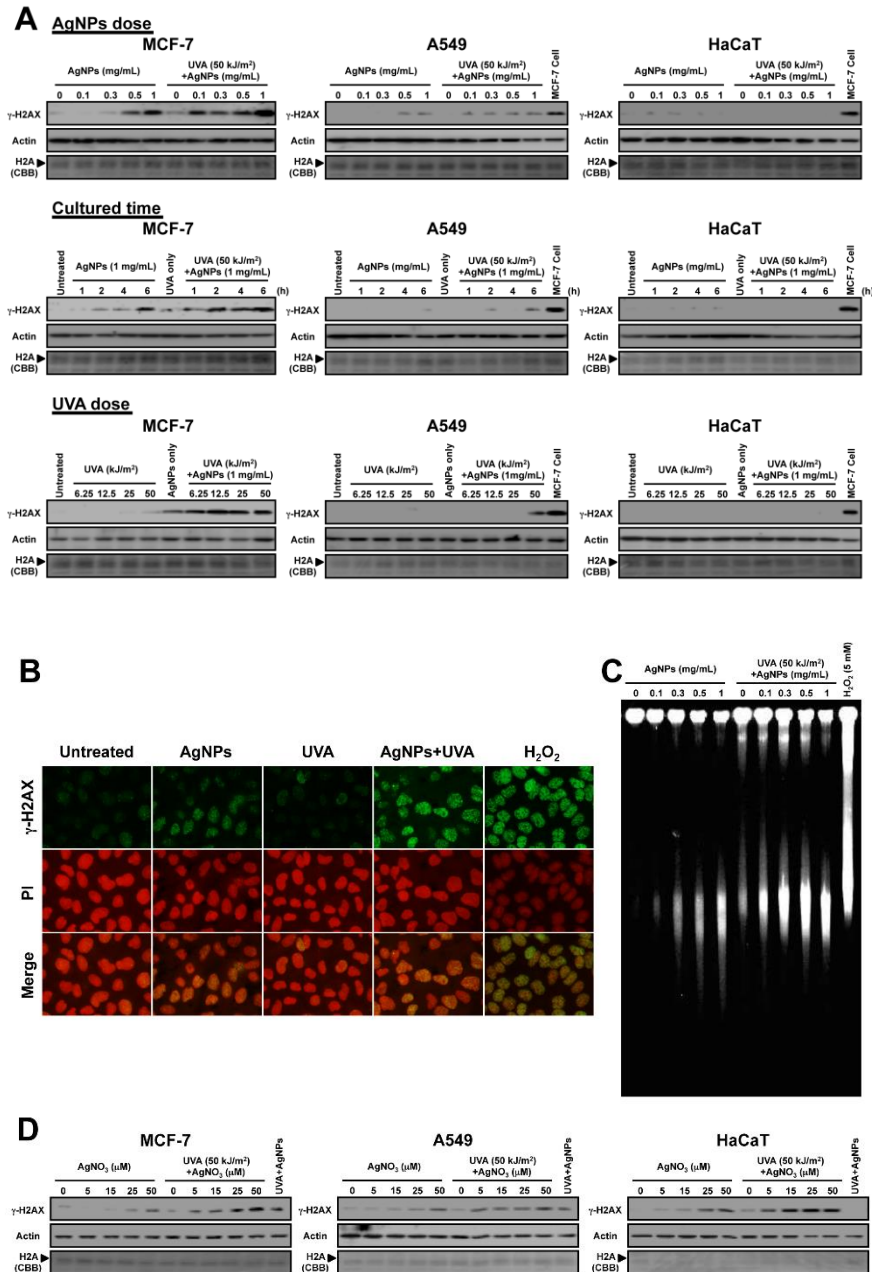


Figure 9. Generation of γ -H2AX and DSBs after combined treatment with AgNPs and UVA

- (A) γ -H2AX detected by western blotting. Cells were treated with AgNPs (~ 1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (6.25 – 50 kJ/m²). The cells were harvested at a predetermined time (1 – 6 h). Actin and CBB staining were used as a standard for equal loading of proteins.
- (B) γ -H2AX foci detected by immunofluorescence staining. MCF-7 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²) or H₂O₂ (5 mM) for 1 h. Cells were fixed for 6 h after treatment, and immunofluorescence staining was performed. Nuclei were stained with PI.
- (C) DSBs detected by BSFGE. MCF-7 cells were treated with AgNPs (~ 1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²) or H₂O₂ (5 mM) for 1 h. Cells were harvested 6 h after the treatment and then analyzed by BSFGE.
- (D) Generation of γ -H2AX after combined treatment with AgNO₃ and UVA. Cells treated with AgNO₃ (5 – 50 μ M) for 4 h were exposed to 50 kJ/m² of UVA. Cells were harvested 6 h after the treatment and then analyzed by western blotting.

2-3-3 銀ナノ粒子の取り込み量と γ -H2AX 亢進の関与

第1章において、*E. coli* に対する殺菌には細胞内への取り込みが重要であることが示されたので、細胞株の違いによる γ -H2AX の生成の違いは、細胞内の AgNPs の取り込み量に関連していると考えた。そこで、各細胞における AgNPs の取り込み量を、FCM の SS 強度により評価した (Fig. 10A)。SS 強度は、AgNPs の作用によって増加した。SS 強度の上昇は、MCF-7 細胞において最も高く、HaCaT 細胞では僅かであった。

一方、UVA 照射下での AgNPs 作用が γ -H2AX を上昇させたことから、AgNPs の取り込み量が UVA 照射により亢進された可能性が考えられる。そこで、MCF-7 細胞において、UVA を照射した後の SS の強度の変化を調べた (Fig. 10B)。SS 強度は AgNPs の作用濃度依存的に増加したが、UVA の照射によって変化しなかった。細胞内へ AgNPs の取り込みは細胞死および DNA 損傷の亢進に関連することが示唆されたが、AgNPs の取り込みは UVA 照射によって影響されなかった。

さらに、AgNPs の取り込みと γ -H2AX 生成の関係を明確するために、第一章で用いた取り込み量が違う 5 つの異なるサイズの銀粒子を用いて実験を行った (Fig. 11)。SS 強度の変化から、直径が $<0.1 \mu\text{m}$ および $2-3.5 \mu\text{m}$ の粒子は、効果的に MCF-7 細胞内に取り込まれた。 $5-8 \mu\text{m}$ 以上の粒子では細胞内に取り込まれなかった (Fig. 11A)。しかし、UVA で照射しても、SS 強度は変化しなかった。細胞内に多く取り込まれる $<0.1 \mu\text{m}$ および $2-3.5 \mu\text{m}$ の銀粒子は、UVA 照射下高い細胞毒性を示した (Fig. 11B)。また、UVA 照射下による γ -H2AX の亢進も、 $<0.1 \mu\text{m}$ の AgNPs のみで観察された (Fig. 11C)。

次に、MCF-7 細胞を用いて、銀粒子サイズ依存的な DSBs の形成を BSFGE により調べた (Fig. 11D)。AgNPs 単独作用では、サイズ依存的に DNA の切断を引き起こした。また、UVA 照射下で $5-8 \mu\text{m}$ 以上の銀粒子の複合作用では、僅かな変化しか認められなかったが、 $<0.1 \mu\text{m}$ および $2-3.5 \mu\text{m}$ の銀粒子作用では、強い DNA の切断が観察された。これらの結果は、より小さいサイズの銀粒子は、細胞内に取り込まれやすく、UVA 照射において強く DSBs を形成することを示唆した。

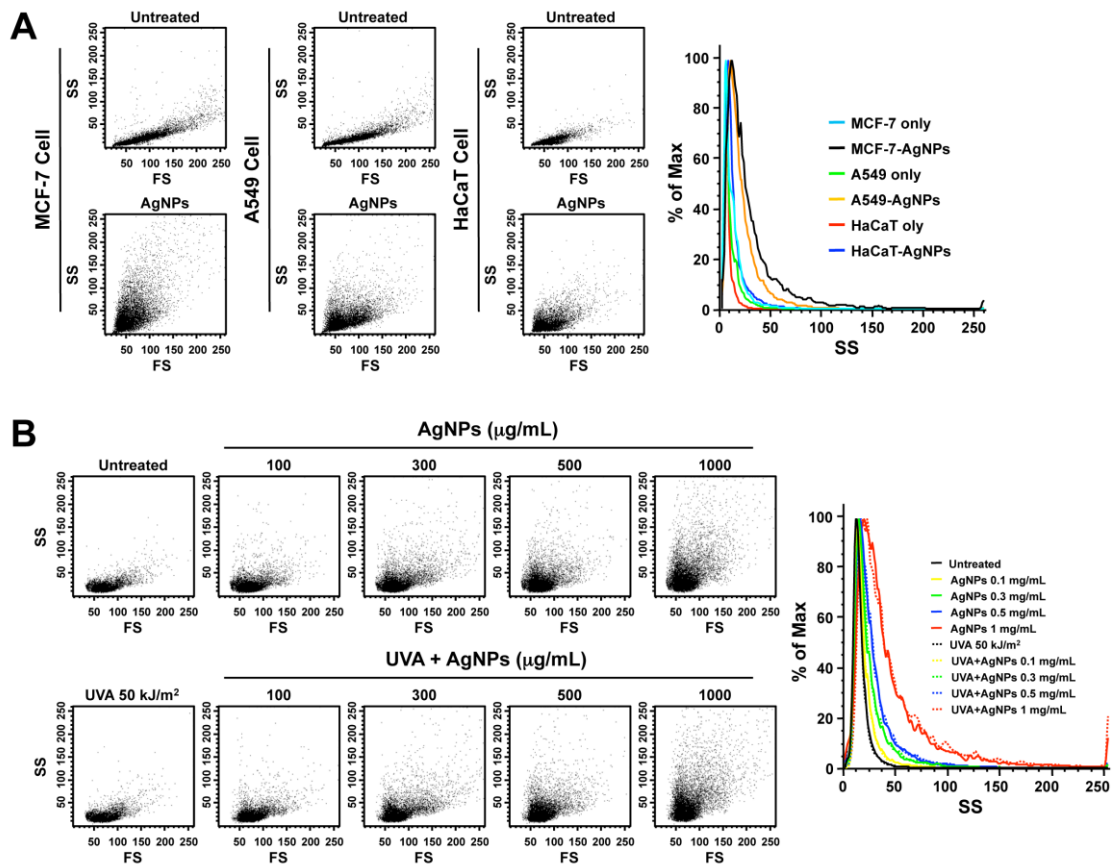


Figure 10. Difference in uptake of AgNPs depending on the cell line

- A) Inter-cellular uptake of AgNPs in the three cell lines. Cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h. FS and SS were analyzed using FCM, and SS intensity was expressed using the histograms.
- B) Inter-cellular uptake of AgNPs after combined treatment with AgNPs and UVA in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with several doses (100 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) of AgNPs for 4 h and exposed to 50 kJ/m^2 of UVA. FS and SS were analyzed using FCM, and SS intensity was expressed using the histograms.

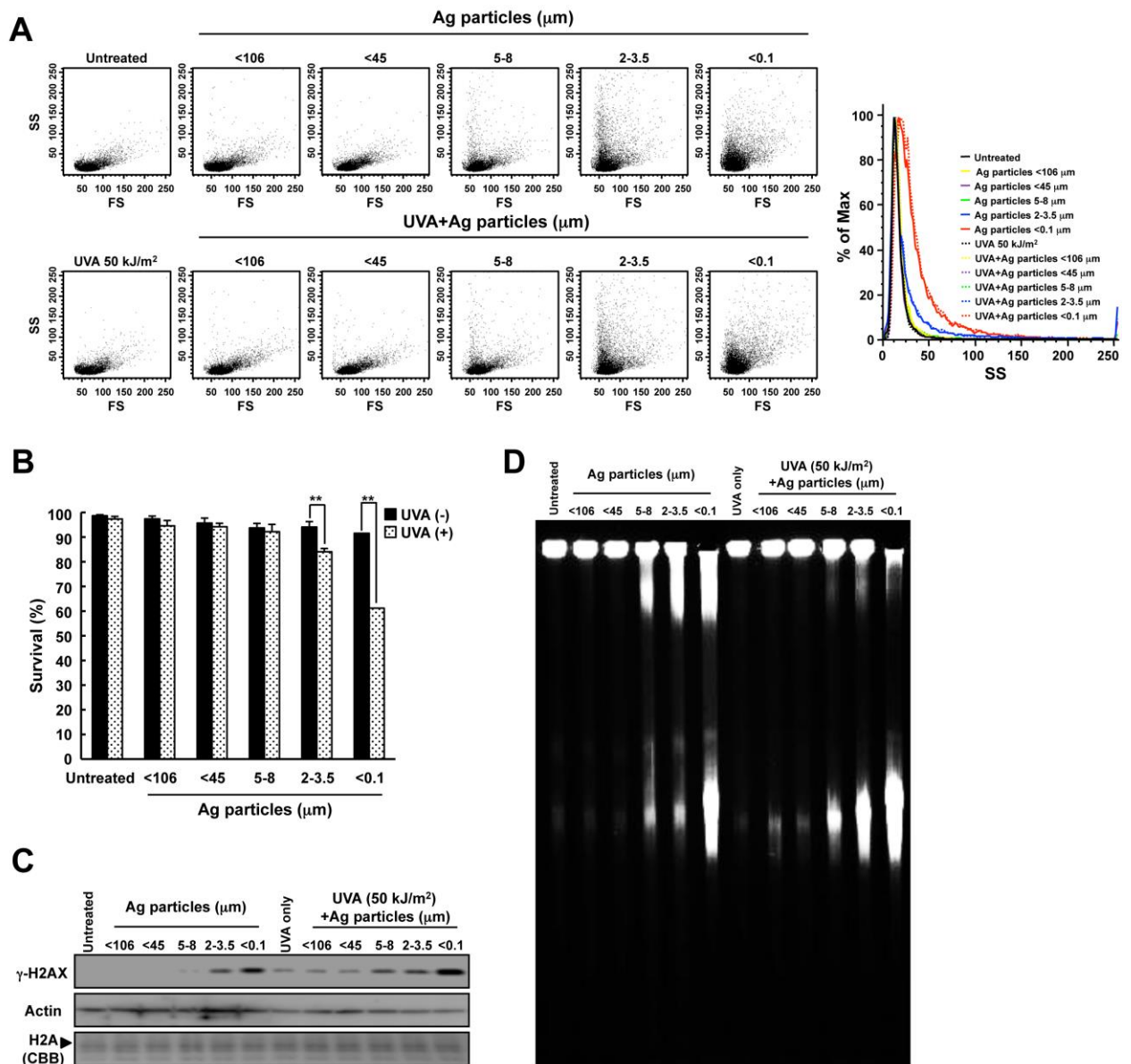


Figure 11. Size-dependent uptake of Ag particles and γ -H2AX generation

- (A) Intercellular uptake of Ag particles. MCF-7 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) of different sizes ($< 0.1 \mu\text{m}$, $2 - 3.5 \mu\text{m}$, $5 - 8 \mu\text{m}$, $< 45 \mu\text{m}$ and $< 106 \mu\text{m}$) for 4 h and exposed to 50 kJ/m^2 of UVA. FS and SS were analyzed using FCM, and SS intensity was expressed using the histograms.
- (B) Size-dependent survival at 24 h. MCF-7 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m^2). Survival was determined by the Trypan blue exclusion assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.
- (C) Size-dependent generation of γ -H2AX. MCF-7 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m^2). Cells were harvested for 6 h after the treatment and then analyzed by western blotting.
- (D) Size-dependent generation of DSBs. MCF-7 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m^2). Cells were harvested for 6 h after the treatment and then analyzed by BSFGE.

2-3-4 DNA 損傷に対する活性酸素種の関与

AgNPs および UVA はそれぞれ ROS に関連する DNA 損傷の一つである 8-OHdG の生成を誘導することが報告されている [19, 20]。Fig. 12A は、MCF-7 における UVA 照射下での AgNPs による 8-OHdG の生成を示している。AgNPs 単独作用は 8-OHdG の量を増加させた。UVA 単独では、わずかな変化しか示さなかった。UVA と AgNPs の複合曝露後、8-OHdG の形成は相乗的に増強された。Fig. 12B は、銀粒子のサイズに伴う 8-OHdG の変化を示している。AgNPs (<0.1 μm) による 8-OHdG の増加に比べ、2–3.5 μm および <45 μm の粒子では、ほとんど効果がなかった。さらに、UVA 照射下では、より小さなサイズの銀粒子において、8-OHdG の形成が亢進した。また、8-OHdG の形成は、UVA 照射下において AgNO_3 により増強された (Fig. 12C)。

AgNPs 表面からリリースした Ag^+ は効果的に細胞内 GSH のような抗酸化分子の SH 基と反応する。よって、細胞内が酸化し、酸化型 DNA 損傷が効果的に生成することが予想される。そこで、まず、AgNPs および UVA 作用した後の細胞内 GSH の量を測定した (Fig. 13A)。細胞内 GSH の濃度は AgNPs を作用することにより減少したが、マイクロサイズの粒子では僅かな変化しか観察されなかった。また、GSH が UVA 照射によって有意に減少した。SH 基を有する NAC は、抗酸化剤および Ag^+ の除去剤の両方としての役割を果たしている。NAC の前処理によって、GSH の減少が回復した。一方、 AgNO_3 を作用しても GSH は減少し、NAC 作用はその減少を回復することが判明した (Fig. 13B)。

次に、MCF-7 細胞における AgNPs による細胞内の酸化を細胞浸透性蛍光プローブ DCFH-DA を用いて解析した (Fig. 13C)。DCF 蛍光強度は、小さいサイズの銀粒子作用により増加し、また、NAC によって抑制された。 AgNO_3 も作用濃度依存的に細胞内酸化を増加させ、完全に NAC によって抑制された (Fig. 13D)。さらに、NAC の存在下における、 $\gamma\text{-H2AX}$ の生成を調べた (Fig. 13E)。NAC は、UVA 照射下での AgNPs により誘導される $\gamma\text{-H2AX}$ を部分的に阻害した。また、NAC の前処理によって、UVA 照射下での AgNPs により亢進した DSBs の形成が抑制された (Fig. 13F)。これらの結果は、AgNPs から放出された Ag^+ が抗酸化分子の SH 基と反応し、その結果、細胞内の酸化状態を制御できず、8-OHdG の生成を誘導し、それが $\gamma\text{-H2AX}$ の原因となったことを示唆した。

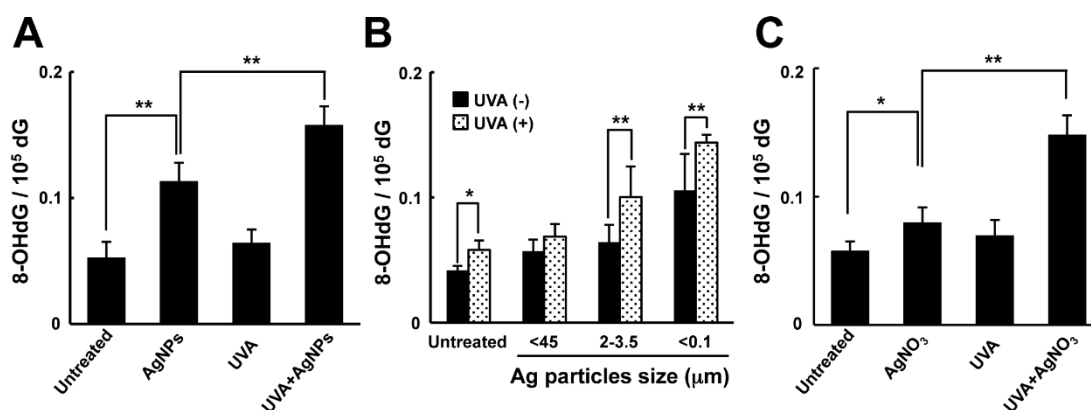


Figure 12. Formation of 8-OHdG after exposure to AgNPs and UVA

- (A) Generation of 8-OHdG after combined treatment with AgNPs and UVA. MCF-7 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²). The level of 8-OHdG was measured using HPLC with an ECD as described in the Materials and Methods.
- (B) Particle size-dependent generation of 8-OHdG. MCF-7 cells were treated with Ag particles of three different sizes (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²).
- (C) Generation of 8-OHdG after combined treatment with AgNO₃ and UVA. MCF-7 cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²).
- Data are presented as the mean ± S.D. (n= 5). **p*< 0.05, ***p*< 0.01.

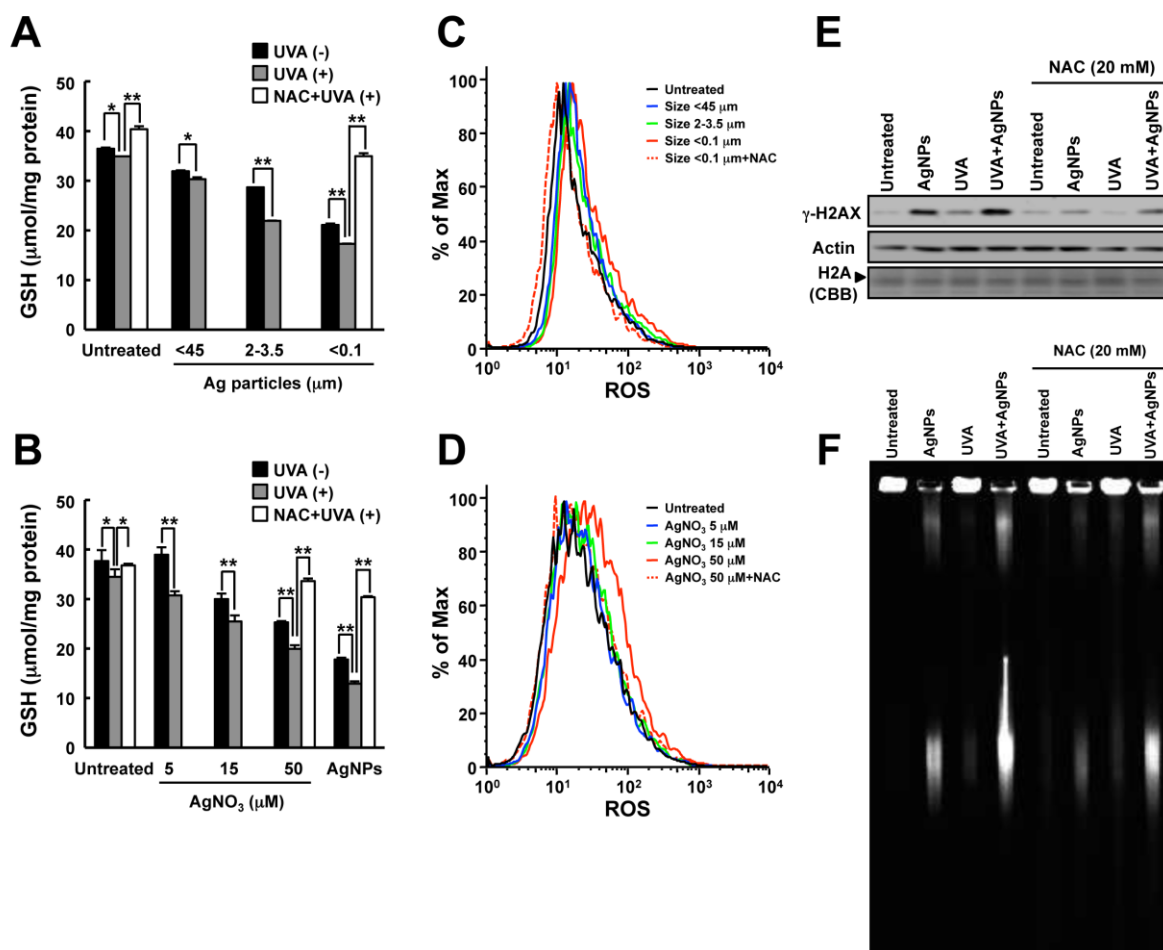


Figure 13. Intracellular oxidation after exposure to AgNPs and UVA

- (A) Intracellular GSH after coexposure to Ag particles of three different sizes and UVA. MCF-7 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 4 h and irradiated with UVA (50 kJ/m²). Cells were harvested immediately after the treatment and GSH was determined using the GSH assay. Values were corrected based on the results of the protein assay. To inhibit the effect of Ag ions, NAC (20 mM) was added 0.5 h before addition of Ag particles. Data are presented as the mean ± S.D. (n= 3). **p*< 0.05, ***p*< 0.01.
- (B) Intracellular GSH levels after coexposure to AgNO₃ and UVA.
- (C) Intracellular oxidation dependent on the size of Ag particles. MCF-7 cells incubated in the presence of DCFH-DA (10 μM) for 0.5 h were treated with Ag particles (1 mg/mL) for 4 h, and DCF intensity were analyzed by FCM. NAC (20 mM) was added 0.5 h before treatment with Ag particles.
- (D) Intracellular oxidation after exposure to AgNO₃. MCF-7 cells incubated in the presence of DCFH-DA (10 μM) for 0.5 h were treated with AgNO₃ (5 – 50 μM) for 4 h.
- (E) Generation of γ-H2AX in the presence of NAC after combined treatment with AgNPs and UVA. MCF-7 cells were incubated with the antioxidant NAC (20 mM) for 0.5 h, then treatment with AgNPs (1 mg/mL) and UVA (50 kJ/m²). Cells were harvested 6 h after the treatment and then analyzed by western blotting.
- (F) Formation of DSBs in the presence of NAC after combined treatment with AgNPs and UVA. MCF-7 cells were incubated with NAC (20 mM) for 0.5 h, then treated with AgNPs (1 mg/mL) and UVA (50 kJ/m²). Cells were harvested 6 h after the treatment and then analyzed by BSGE.

2-4 考察

γ -H2AX は、DSBs の形成後の早期の細胞応答である[41]。DSBs は、酸化型 DNA 損傷、DNA 付加体、SSBs および DNA クロスリンクなどの DNA 損傷の修復、DNA 複製フォークの進行停止など、様々な原因により生じる[42,43]。従って、 γ -H2AX は、DNA 損傷のマーカーとみなされている。AgNPs 単独作用は、明らかに γ -H2AX を誘導し、また、AgNO₃ も同様の効果を示した (Fig. 9A and D)。AgNPs が γ -H2AX を誘導する理由を考えると、一つは細胞内に取り込まれた AgNPs が直接 DNA に作用し、物理的に DSBs を引き起こした可能性である。しかし、AgNPs により誘導された γ -H2AX は、その形成に長い培養時間 (Fig. 9) を必要としたことから、AgNPs は DNA を物理的に切断しなかったと考えられる。一方、細胞内に取り込まれた AgNPs から放出された Ag⁺は、GSH などの抗酸化剤分子中の SH 基と反応し、細胞内の酸化の形成を誘導し、間接的に DSBs を引き起こす可能性が考えられる。細胞内の酸化および ROS の形成は、8-OHdG を含むいくつかの酸化型 DNA 損傷を誘導し、それらの損傷は、複製フォークの衝突の結果、DSBs を誘導することが報告されている[44,45]。また、8-OHdG は反対鎖上の三つ以上のヌクレオチドを離れて位置する場合、DNA グリコシラーゼを認識し、両方の損傷部位で切断され、DSBs を生じることが可能である[46,47]。さらに、ROS は、SSBs を誘導することもよく知られている。8-OHdG および SSBs からなる多重損傷部位は、DSBs になる可能性が報告されている[48]。

AgNPs による誘導される γ -H2AX の生成は UVA 照射下で著しく増強された。UVA は ROS を誘導し、8-OHdG および SSBs を形成することが知られている[21]。しかし、UVA 照射下での AgNPs による誘導された γ -H2AX は、それぞれ単独作用の相加というよりも、相乗的であった。UVA 照射では、ROS を形成し、細胞抗酸化能力をさらに低下させることが考えられる。また、UVA 照射下では、酸化により AgNPs からリリースする Ag⁺の量が大幅に増加することを第一章で証明し、これはさらに抗酸化剤分子の SH 基と反応することができる。Ag⁺と GSH および Cysteine のような細胞内抗酸化剤分子の反応の増加は、細胞内の酸化をさらに亢進し、8-OHdG の生成につながるものが考えられる。

亜ヒ酸、クロム、ニッケル、カドミウムおよび鉛などのいくつかのタイプの金属は、UV 誘発性突然変異および発がん性を高めることが報告されている[49-51]。中でも、亜ヒ酸のメカニズムはよく検討されてきた。ヌクレオチド除去修復および塩基除去修復の阻害[52,53]によって、非変異原性の低濃度の亜ヒ酸は、UV による皮膚がんの発がん率を高める[50]。亜ヒ酸は xeroderma pigmentosum group A protein (XPA)、poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) および zinc finger DNA-binding proteins などのいくつかの DNA 損傷修復蛋白質の活性を阻害する[52]。PARP-1 を阻害すると、ROS によって形

成される 8-OHdG の修復が抑制される[54]。AgNPs は酸化されたプリンを認識および除去する塩基除去修復酵素である formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) を阻害し[55]、さらに、DNA 損傷応答修復システムに関与する遺伝子をダウンレギュレーションすることも報告されている[56]。このことから、UVA 照射下において、AgNPs による DSBs および γ -H2AX の生成が相乗的に亢進するもう一つ可能性として、AgNPs が DNA 損傷修復を阻害することが考えられる。これについては、今後詳細な検討を行う必要がある。

MCF-7 細胞は、3 つの細胞株の中で、UVA 照射下での AgNPs 作用に対する最も高い感受性を持っていた。以前の報告では、腎上皮 A498 細胞およびマクロファージ RAW 264.7 細胞は、AgNPs の毒性効果に対して高い感受性を示し、そして肺上皮 A549 細胞は低い感受性を有することが報告されている[16]。RAW 264.7 細胞に対する高い、そして A549 細胞に対する低い感受性は、銀および他の金属ナノ粒子を用いて実証されている[57]。これらの研究は、本研究の結果と一致した。

また、種々の細胞株に対する AgNPs の細胞毒性および遺伝毒性は、粒子サイズ依存していることが報告されている[15,58]。3 種類の AgNPs (<5、<20 および <50 nm) を、4 種類の細胞に作用した場合、より小さな AgNPs の方が、より容易に細胞に入る[15]。さらに、*in vivo* では、より小さな AgNPs がより容易に肺の炎症を誘発した[59]。本研究では、MCF-7 細胞における AgNPs の細胞内の取り込み量は 3 つの細胞株の中で、最も高いことを示した。また、MCF-7 細胞における AgNPs のサイズ依存的な取り込みは、生存率の変化および γ -H2AX の誘導と関連していた。さらに、より小さなサイズの AgNPs は、より効果的に細胞内を酸化し、酸化型 DNA 損傷を誘導した。

一方、細胞死および γ -H2AX の生成には、細胞内に取り込まれた AgNPs からの Ag⁺ の放出が必要と考えられた。UVA 照射下での AgNO₃ 作用では、生存率の低下および γ -H2AX の生成は、全ての細胞株において観察された。本研究では、使用した AgNPs から放出された Ag⁺ の濃度は、使用する AgNO₃ の濃度よりはるかに低かったが、AgNPs が細胞内に取り込まれるのであれば (MCF-7 細胞)、AgNO₃ と同じ程度の細胞死や γ -H2AX を引き起こすことが認められた (Fig. 8 and 9)。つまり、細胞内で Ag⁺ が連続的に放出されることは、細胞死および γ -H2AX の形成において重要であることが考えられた。

第 2 章の内容を Fig. 14 にまとめた。第 2 章においては、UVA 照射下における AgNPs 作用によりヒト培養細胞における DSBs とそれに伴う γ -H2AX の生成が亢進することを実証した。強い γ -H2AX の生成は、ナノサイズの AgNPs の細胞内の取り込みおよび細胞内での持続的な Ag⁺ の放出による細胞内抗酸化能力の低下によりもたらされた。DSBs および γ -H2AX の誘導は、UVA の照射によってさらに増強された。DSBs は修復

ミスが起こりやすい損傷であることから、遺伝子的に不安定な状態となり発がんにつながる可能性がある。この観点から、本研究が明らかにした UVA 照射下における AgNPs による DSBs とそれに伴う γ -H2AX の増加は、複合曝露時の遺伝毒性評価において新しい知見を提案したことになる。

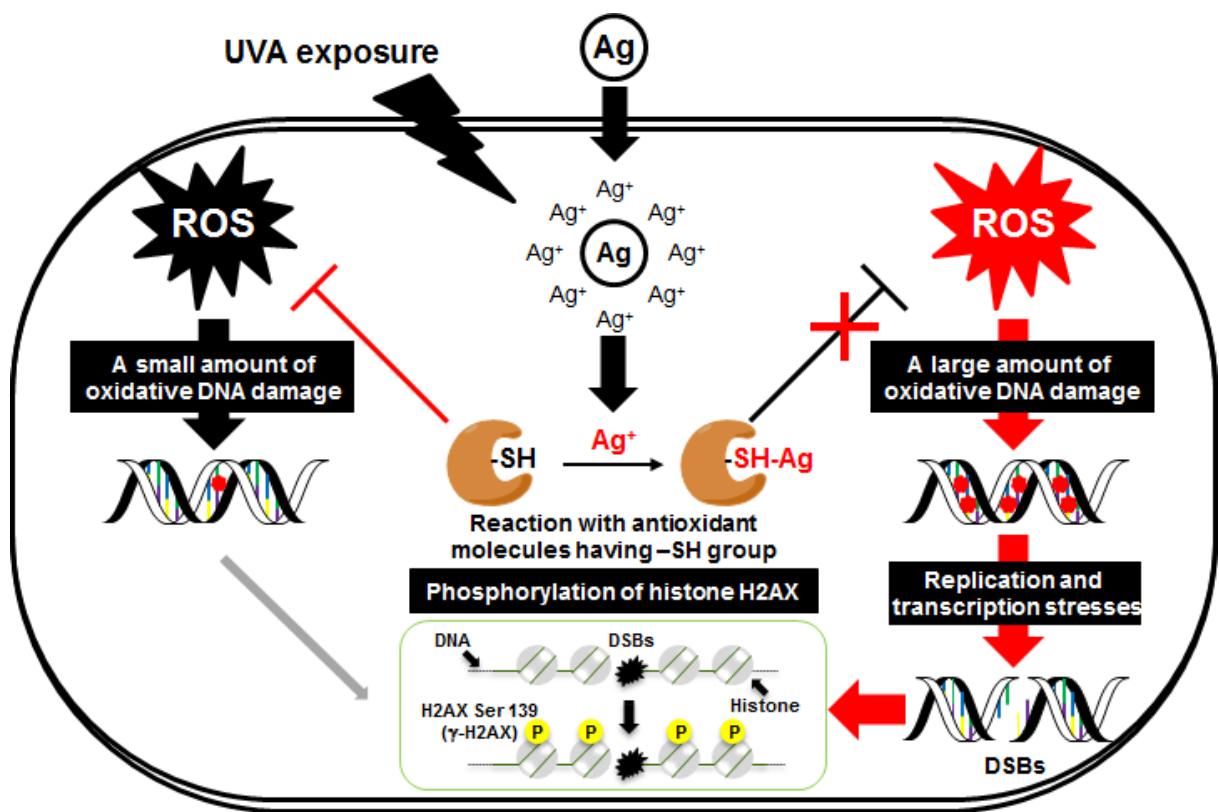


Figure 14. Incorporation of AgNPs and phosphorylation of histone H2AX

第3章 銀イオン存在下における UVB 照射によるヒト培養細胞への影響

3-1 序論

第1、2章において、UVA 照射下における AgNPs 作用による *E. coli* に対する殺菌効果の増大、およびヒト培養細胞に対する DNA 損傷の亢進を明らかにした。これまで、UVA を用いて検討してきたが、実際は、我々は太陽光から UVA だけでなく、短波長の UVB も同時に曝露されている。

UVB と UVA では DNA を損傷する機構が全く異なる。DNA の吸光度は 260 nm 付近に吸収極大を有する。UVB は高エネルギーを有するため、直接 DNA 塩基に吸収され、それら塩基を励起する。励起された DNA 塩基が基底状態に戻る際に CPDs や 6-4PPs が形成される。CPDs や 6-4PPs が正常に修復されない場合は、突然変異を生じ、がんのリスクの増加につながる[22]。

一方、第1、2章において、UVA 照射下における AgNPs 作用による高い殺菌効果および重篤な DNA 損傷は、*E. coli* およびヒト細胞内に取り込まれた AgNPs から Ag⁺が放出されることが原因であることを明らかにした。従来、Ag⁺はヒトに対して非毒性であると考えられてきた。ヒトに対する Ag⁺の影響を調査した研究は非常に限られている。ヒトに対する Ag⁺の毒性を示す証拠は、近年の銀の使用増加に対する懸念に対応して行われた最近の研究によりもたらされた。Ag⁺は SH を有する抗酸化分子との反応を介して、ROS を生成し[60]、また、蛋白質および DNA と相互作用することが報告されている[61,62]。Ag⁺と DNA の相互作用は、DNA 吸収エネルギーおよび DNA の立体構造を変化させ、UVB による DNA 損傷生成に影響する可能性が考えられる。例えば、Ag⁺と結合した DNA は、UVB 照射による CPDs の生成を増強するという報告がある[63]。詳細は明らかにされていないが、おそらく、Ag⁺は重原子効果を引き起こし、CPDs の前駆体を誘導すると考えられる。このことから、Ag⁺をリリースする AgNPs が UVA だけでなく、UVB 照射下においても、より重篤な DNA 損傷を引き起こす可能性が考えられる。従って、AgNPs と UVB の複合曝露による DNA 損傷生成の変化を評価することは、ヒトへの複合影響を検討する上で重要である。

本研究では、当初、ヒト培養細胞に AgNPs を作用し、UVB 照射後、DNA 損傷生成の変化を検討する予定であった。しかしながら、本研究が採用している実験系では、UVB は AgNPs の存在下で遮光されてしまうため、検討することが不可能だった。これまでの検討で、AgNPs から遊離する Ag⁺が重要であることが分かってきたので、本章では、AgNPs の代わりに AgNO₃ (Ag⁺) を用いて、細胞内に取り込まれた AgNPs から Ag⁺が放出される状態を模倣し、CPDs および 6-4PPs 生成の変化を中心に検討を行った。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 実験材料

第2章 2-2-1 に示したヒト皮膚細胞 HaCaT、および第1章 1-2-1 に示した UVB チューブ (280–320 nm (Peak: 310 nm)) を用いた。

3-2-2 細胞の培養

第2章 2-2-2 に示したヒト皮膚細胞 HaCaT を用い、培養した。

3-2-3 硝酸銀作用および UVB 照射

第2章 2-2-3 に示したように AgNO₃ 作用および UVB 照射した。

3-2-4 細胞の生存率の測定

第2章 2-2-4 と同様に、AgNO₃ 作用および UVB 照射した後、細胞の生存率をトリパンプルー法で測定した。

3-2-5 ウェスタンブロット法による γ -H2AX の検出

第2章 2-2-5 と同様に、Western blotting によって γ -H2AX の検出を行った。

3-2-6 免疫染色法による γ -H2AX 像の検出

第2章 2-2-6 と同様に、免疫染色法によって γ -H2AX の検出 (フォーカスの検出) を行った。

3-2-7 γ -H2AX と細胞周期の相関の解析

FCM を用いて HaCaT 細胞における γ -H2AX の誘導と細胞周期の解析を行った。AgNO₃ と UVB を処理した HaCaT 細胞をトリプシンで回収し、70%の ethanol にて12時間に固定した。PBS で3回洗浄後、200 μ L の FCM 用溶液 (0.2% TritonX-100, 1% BSA) に懸濁した。5分間後、FCM 用溶液によって1/100に希釈した一次抗体を0°Cで2時間反応させた。さらに、FCM 用溶液で3回洗浄し、同じく FCM 用溶液によって1/100に希釈した二次抗体を2時間反応させた後、FCM 用溶液で3回洗浄した。FCM 専用チューブの底に2 μ L の PI 溶液 (20 μ g/mL) および1 μ L の RNase 溶液 (20 μ g/mL) を加え、FCM 用溶液で1 mL に調製したサンプルを添加した。FCM にて fluorescein isothiocyanate (FITC) と PI の蛍光を測定した。

γ -H2AX 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-phospho-H2A.X (Ser139), clone JBW301 (mouse monoclonal) (Millipore, MA, USA)

二次抗体：Flourescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

3-2-8 免疫染色法による CPDs 像の検出

γ -H2AX の生成と CPDs 損傷の関与を解析するため、細胞核の一部のみに損傷を誘発した。HaCaT 細胞を 35 mm ガラス底ディッシュ ($\phi=12$ mm; Iwaki, Japan) にまき、第 2 章 2-2-2 に示したように HaCaT 細胞を培養した。AgNO₃ を 1 時間処理した後、DMEM 培地を除去した。メンブレンフィルター ($\phi=3$ μ m; Millipore, MA, USA) の小孔を利用して、細胞の 1-3 ヶ所をスポット状に UVC (Peak: 254 nm) (Atto, Japan) を 0.1 kJ/m² 照射した。また、UVC の照射線量は検出器 (Atto, Japan) を用いて同時に測定した。検出器をサンプルと同じ距離に設置し、25 秒毎に照射量は 0.1 kJ/m² とするために、サンプルと紫外線チューブの間の距離を調整した。照射後、メンブレンフィルターを除去し、照射した直後および 1 時間後の HaCaT 細胞を 6% formalin で 15 分間、さらに、2% の TritonX-100 溶液で 3 分間に固定された。3 分間後、PBS で 3 回洗浄し、0.2% TritonX-100, 1% BSA 溶液によって 1/100 に希釈した γ -H2AX の一次抗体を 2 時間反応させた。一次抗体を反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、同じく 0.2% TritonX-100, 1% BSA 溶液 1/100 に希釈した γ -H2AX の二次抗体を 2 時間反応させた。2 時間後、細胞をさらに 6% formalin で 15 分間固定した。固定した後、2 mL の 2N HCL 溶液で 30 分間に室温静置した。PBS で 3 回洗浄し、PBS によって 1/3000 に希釈した CPDs の一次抗体を 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、さらに PBS によって 1/100 に希釈した CPDs の二次抗体を 2 時間反応させた。二次抗体反応後、PBS で 3 回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 (20 μ g/mL) で染色した。マウント溶液を滴下した上にカバーガラスをかぶせた。蛍光顕微鏡によって検出した。

γ -H2AX 検出のための一次および二次抗体は 3-2-7 に示した通りである。

CPDs 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) (Cosmo Bio, Japan)

二次抗体：Cy5-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

3-2-9 ELISA 法による CPDs および 6-4PPs の検出

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による HaCaT 細胞への、および細胞から抽出した DNA への AgNO_3 存在下における UVB 照射後の CPDs および 6-4PPs の検出を行った。

細胞の場合は、HaCaT 細胞に AgNO_3 を作用した後、UVB ($0.1-0.3 \text{ kJ/m}^2$) を照射した。その後、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Japan) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は最終的に蒸留水 $200 \mu\text{L}$ に溶解した後、 260 nm の吸収波長によって測定した (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。

細胞から抽出した DNA の場合は、HaCaT 細胞から DNA を抽出し、実験サンプルとした。DNA 濃度を $2 \mu\text{g/mL}$ (CPDs) および $40 \mu\text{g/mL}$ (6-4PPs) になるようにそれぞれ調整し、 AgNO_3 と 20°C で 1 時間反応した。反応した後、UVB ($0.2-0.4 \text{ kJ/m}^2$) を照射した。

実験前日、96 well plate に $50 \mu\text{L}$ 0.003% protamine sulfate solution 溶液を 37°C で一晩コーティングした。上述抽出した DNA は、CPDs および 6-4PPs 用サンプルの DNA 量を $0.2, 4 \mu\text{g/mL}$ になるようにそれぞれ調製し、ウォーターバスを用いて、 100°C で 10 分間 DNA 変性した。氷上に 15 分冷却し、一晩コーティングした 96 well plate によくスピンドウンした CPDs および 6-4PPs 用サンプルを $50 \mu\text{L/well}$ 加えた。 37°C で一晩インキュベートした後、 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、well を乾かさないうように $50 \mu\text{L}$ の 2% FBS を入れた。さらに、フィルムで密閉し、 37°C で 30 分間インキュベートした。 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、PBS によって $1/3000$ に希釈した Anti-cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) (Cosmo Bio, Japan) または、 $1/1500$ に希釈した Anti-(6-4) photoproducts (6-4PPs) (Cosmo Bio, Japan) を $100 \mu\text{L/well}$ 入れた。さらに、フィルムで密閉し、 37°C で 30 分間インキュベートした。 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、PBS によって $1/2000$ に希釈した Biotin-F (ab') 2 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen, CA, USA) 抗体を $100 \mu\text{L/well}$ 入れた。さらに、フィルムで密閉し、 37°C で 30 分間インキュベートした。 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、PBS によって $1/10000$ に希釈した Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate (Invitrogen, CA, USA) を $100 \mu\text{L/well}$ 入れた。さらに、フィルムで密閉し、 37°C で 30 分間インキュベートした。 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、クエン酸 Buffer (citric acid monohydrate 5.1 g 、 Na_2HPO_4 7.3 g を蒸留水 1 L にしたもの) を $150 \mu\text{L/well}$ 入れた。5 分間後、クエン酸 Buffer を除去し、基質溶液 (o-phenylene diamine 8 mg 、 H_2O_2 $4 \mu\text{L}$ 、クエン酸 Buffer 20 mL) を $100 \mu\text{L/well}$ 入れた。さらに、フィルムで密閉し、 37°C で 30 分間インキュベートした後、 $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ を $50 \mu\text{L/well}$ 加え、マイクロプレートリーダーを用いて 492 nm で吸光度を測定した。

3-2-10 DNA に結合した銀イオン量の測定

DNA に結合した Ag^+ の濃度を ICP-AES を用いて分析した。 AgNO_3 を作用した細胞は、0.6 mL 1% の n-lauroylsarcosine sodium salt によって溶解した。溶解物は、0.6 mL CsCl (1.5 g/mL) の上に添加し、その後、298000 g (90000 rpm)、27°C で 12 時間超遠心する (Hitachi, Japan) ことによって細胞内 DNA を分離した。

3-2-11 検定

第 1 章 1-2-9 を示したように、有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置 ANOVA により行った。また、Fig. 18 は Mann-Whitney U test により行った。統計的な有意性は、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ で表した。

3-3 実験結果

3-3-1 銀イオン存在下における UVB 照射後の細胞生存率

HaCaT 細胞に AgNO_3 を 1 時間作用した後、UVB (Peak: 310nm) を照射した (Fig. 15)。 AgNO_3 単独では生存率の低下はわずかであった。UVB 作用では照射量依存的に生存率が低下した。一方、 AgNO_3 存在下 UVB を照射させると顕著な生存率の低下が観察された (Fig. 15A)。 AgNO_3 存在下における UVB 照射による生存率の低下は、 AgNO_3 の作用濃度依存的、また UVB の照射量依存的に亢進した (Fig. 15B and C)。さらに、UVB 照射前の AgNO_3 の作用時間が長いほど細胞毒性は顕著であった (Fig. 15D)。これらの結果は、 AgNO_3 と UVB 照射が相乗的にヒトの細胞に影響を与えることを示唆していた。

3-3-2 銀イオン存在下における UVB 照射後の γ -H2AX の亢進と細胞周期の関与

免疫染色法によって AgNO_3 と UVB 作用後の γ -H2AX の検出を行った。核内の γ -H2AX の画像を Fig. 16A に示す (左：拡大像；右：全体像)。 AgNO_3 単独作用では γ -H2AX のフォーカスは認められないが、UVB 照射では、 γ -H2AX のフォーカスが出現した。また、 AgNO_3 存在下の UVB 照射により顕著な γ -H2AX のフォーカスが出現した。UVB 照射により誘導される γ -H2AX は 3 つのパターンを示すことが報告されている [64]。large foci (巨大な離散点状フォーカス)、small foci (小さいな離散点状フォーカス)、および pan-nucleus distribution (核内全体が染まっているようなフォーカス) である。本研究では、 AgNO_3 存在下における UVB 照射により、数多くの small フォーカスが生じ、核内で高い蛍光を示した (Fig. 16A③-⑤)。

次に、Western blotting によって AgNO_3 と UVB 作用後の γ -H2AX の検出を行った。 AgNO_3 存在下における UVB 照射では、それぞれの単独作用よりも強い γ -H2AX が観

察された (Fig. 16B)。またそれは、AgNO₃の作用濃度、UVBの照射量、AgNO₃の照射前の作用時間に依存した (Fig. 16C, D and E)。

さらに、 γ -H2AXの生成と細胞周期との関係を解析した (Fig. 17)。作用後1時間においては、AgNO₃およびUVB作用は細胞周期に影響を与えなかった (Fig. 17A)。UVB照射後の γ -H2AXの誘導は細胞周期の全ての段階で観察され、複製期で特に強かった (Fig. 17B)。一方、AgNO₃存在下におけるUVB照射後の γ -H2AXの有意な誘導は、細胞周期とは無関係であり、全ての周期で強い上昇が見られた (Fig. 17B)。

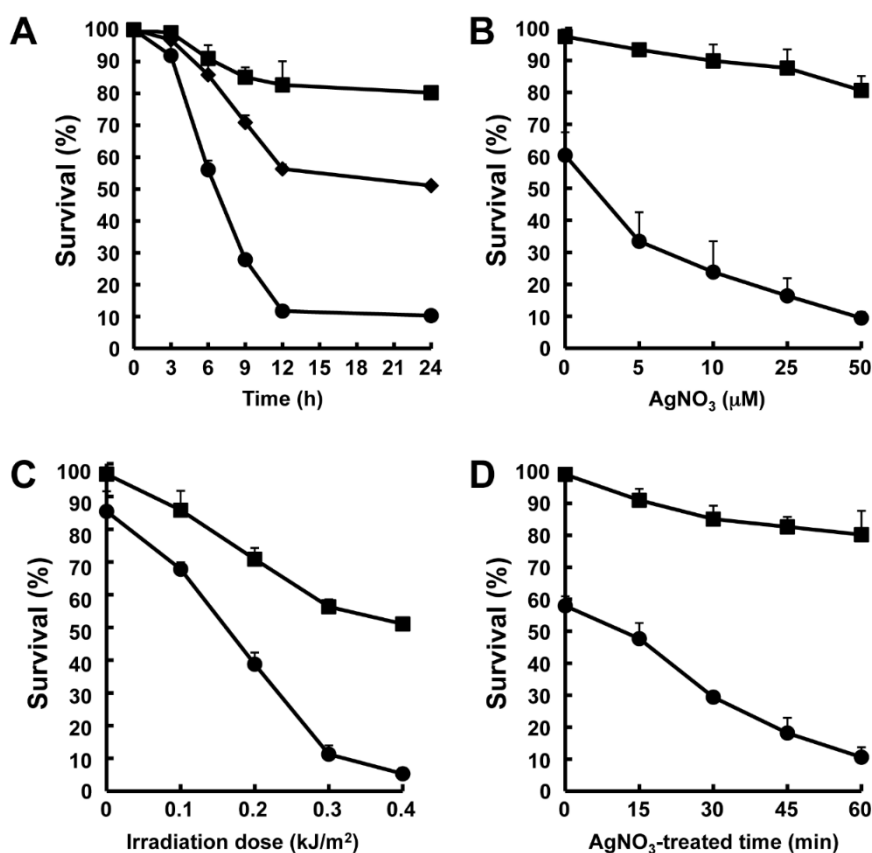


Figure 15. Cytotoxicity of the combined treatment with Ag⁺ and UVB

Cell survival was determined at each indicated time after treatment with AgNO₃ and UVB by the Trypan blue exclusion assay.

- (A) Time-dependent survival. Cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for 1 h and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). ■: AgNO₃; ◆: UVB; ●: AgNO₃ + UVB.
- (B) AgNO₃-dose-dependent survival at 24 h. Cells were treated with AgNO₃ (5 – 50 μM) for 1 h and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). ■: AgNO₃; ●: AgNO₃ + UVB.
- (C) UVB-dose-dependent survival at 24 h. Cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for 1 h and irradiated with UVB (0.1 – 0.4 kJ/m²). ■: UVB; ●: AgNO₃ + UVB.
- (D) AgNO₃-treated time-dependent survival at 24 h. Cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for a predetermined time (0 – 1 h) and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). ■: AgNO₃; ●: AgNO₃ + UVB.

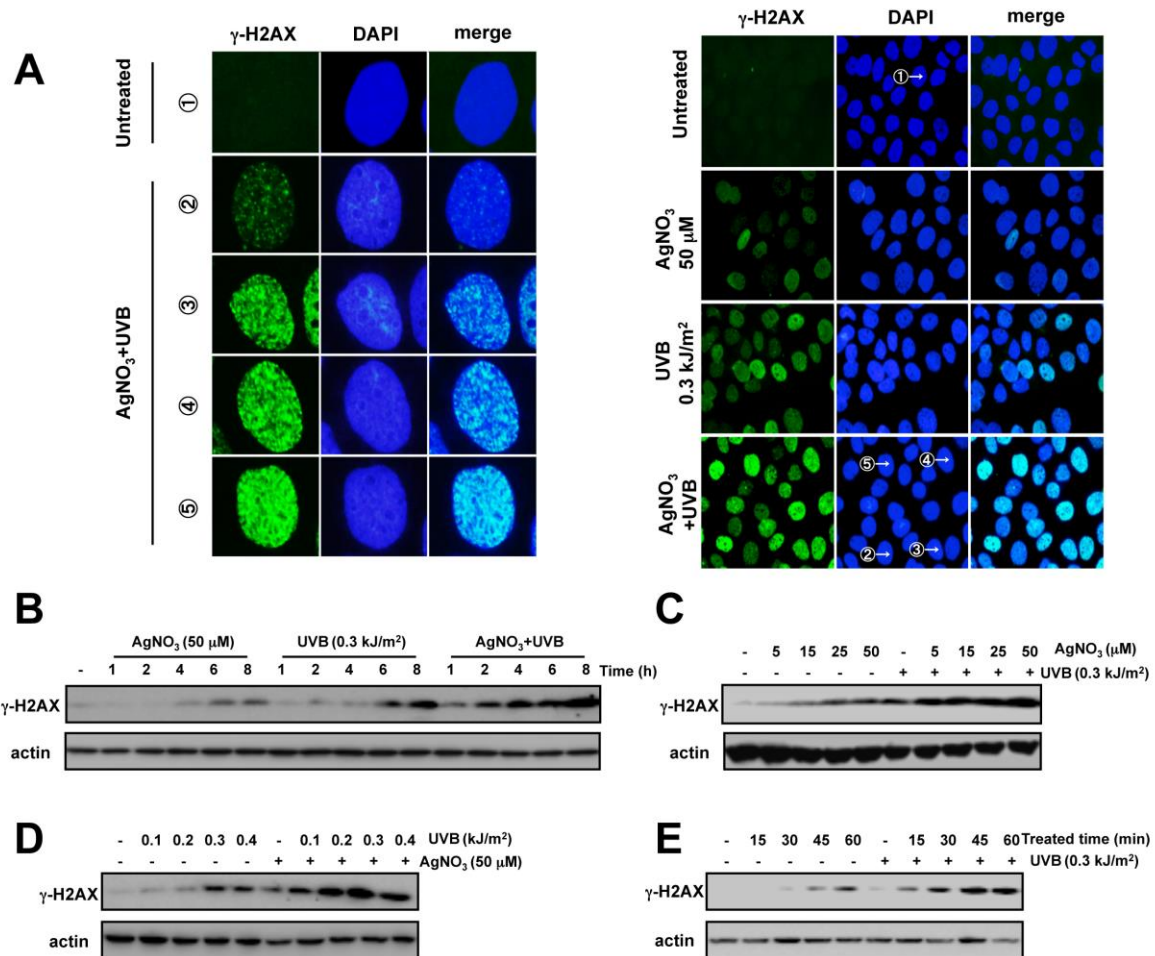


Figure 16. Generation of γ -H2AX after the combined treatment with Ag⁺ and UVB

- (A) Left panels: magnified images of γ -H2AX signals 1 h after the treatment with AgNO₃ (50 μ M) and UVB (0.3 kJ/m²). Right panels: images of γ -H2AX 1 h after the treatment with AgNO₃ (50 μ M) and/or UVB (0.3 kJ/m²). Left side images: γ -H2AX, middle images: DAPI staining, right side images: merged images of γ -H2AX and DAPI. Numbered cells (① – ⑤ in right panels) are shown as magnified images in left panels.
- (B) Time-dependent generation of γ -H2AX foci. Cells were treated with AgNO₃ (50 μ M) for 1 h and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). Cells were harvested at a predetermined time (1 – 8 h).
- (C) AgNO₃-dose-dependent generation of γ -H2AX. Cells were treated with AgNO₃ (5 – 50 μ M) for 1 h and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). Cells were harvested 1 h after the treatment.
- (D) UVB-dose-dependent generation of γ -H2AX. Cells were treated with AgNO₃ (50 μ M) for 1 h and irradiated with UVB (0.1 – 0.4 kJ/m²). Cells were harvested 1 h after the treatment.
- (E) AgNO₃-treated time-dependent generation of γ -H2AX. Cells were treated with AgNO₃ (50 μ M) for each indicated time (0 – 1 h) and irradiated with UVB (0.3 kJ/m²). Cells were harvested 1 h after the treatment.

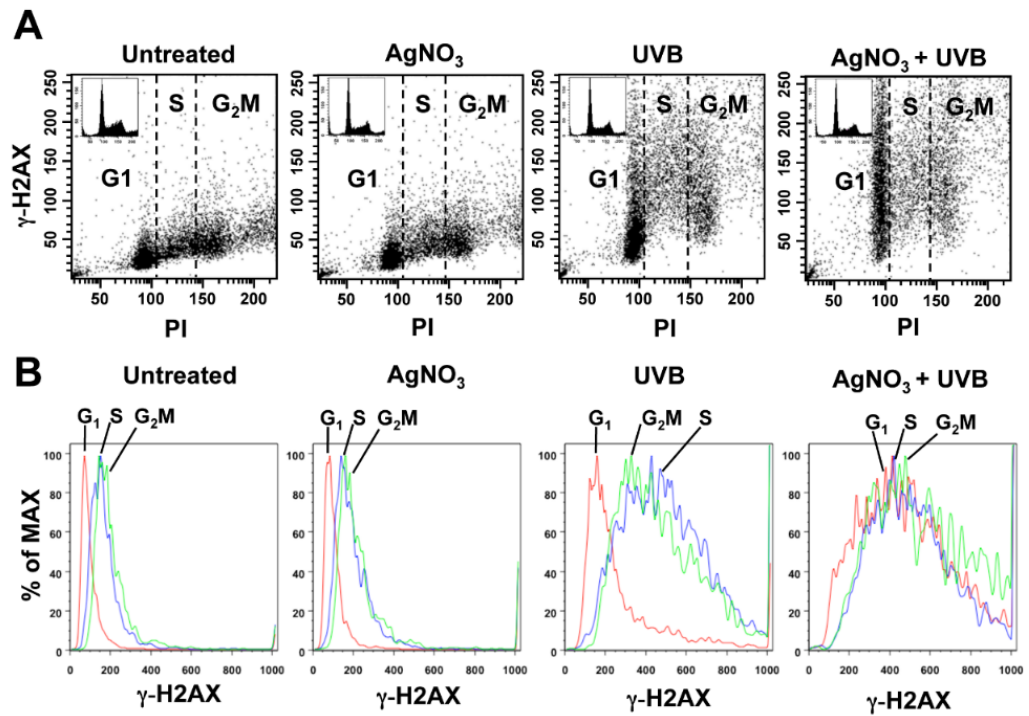


Figure 17. Relationship between generation of γ -H2AX and the cell cycle phase

- (A) Cells treated with AgNO₃ (50 μ M, 1h) and/or UVB (0.3 kJ/m²) were fixed 1 h after the treatments, and stained with antibodies for γ -H2AX and PI. The cell cycle phase and corresponding generation of γ -H2AX were analyzed using FCM. Inserts in dot-plots show cell cycle distribution analyzed by PI staining.
- (B) The cells in each cell phase in Figure 17A were gated and the distribution of the fluorescence intensities of γ -H2AX was shown as histograms.

3-3-3 ピリミジン二量体の生成に与える銀イオンの影響

UVB が照射されると、細胞の中で CPDs および 6-4PPs が形成される[22]。これらの損傷は、DNA 複製または修復の際に DSBs を引き起こし、H2AX をリン酸化させる。そこで、AgNO₃ と UVB 照射により γ -H2AX が亢進した理由を上記した CPDs や 6-4PPs の生成率の違いに焦点をあて検討した。

まず、UVC をフィルター越しに部分照射した。フィルターを通して UVC が照射された細胞核内部分に生成する丸状の γ -H2AX および CPDs フォーカスを分析した。 γ -H2AX フォーカスは、UVC 照射の直後には検出されなかったが、それらは 1 時間後、明らかに CPDs と同じ位置で観察された (Fig. 18A)。また、UVC 照射により誘導された γ -H2AX フォーカスの蛍光強度は、AgNO₃ 未処理細胞に比べ AgNO₃ を処理した細胞で有意に高かった (Fig. 18B)。これらの結果は、AgNO₃ 処理した細胞における γ -H2AX フォーカス生成の亢進は CPDs 形成の増加によるものであったことを示唆した。

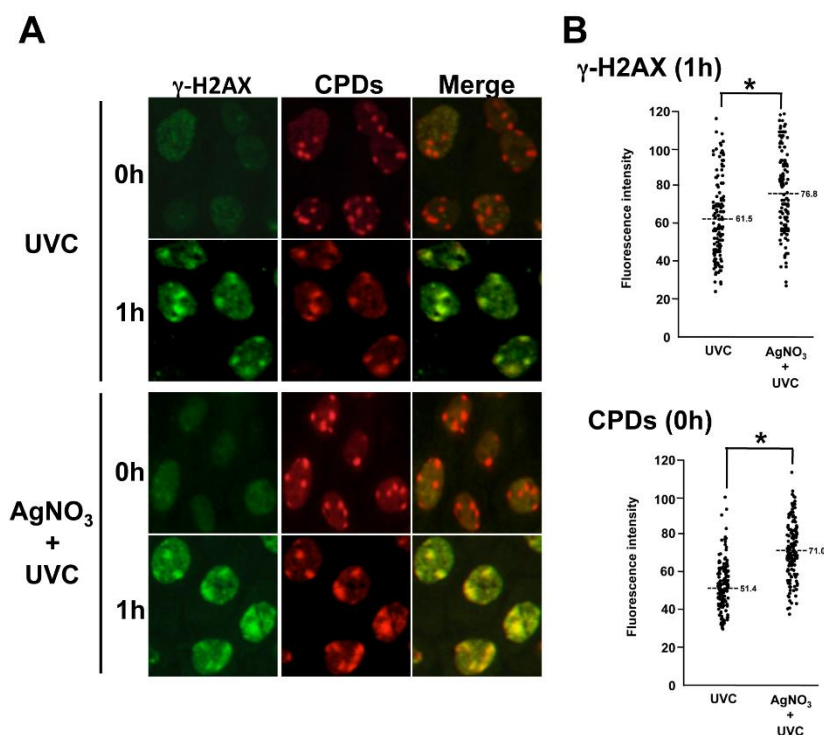
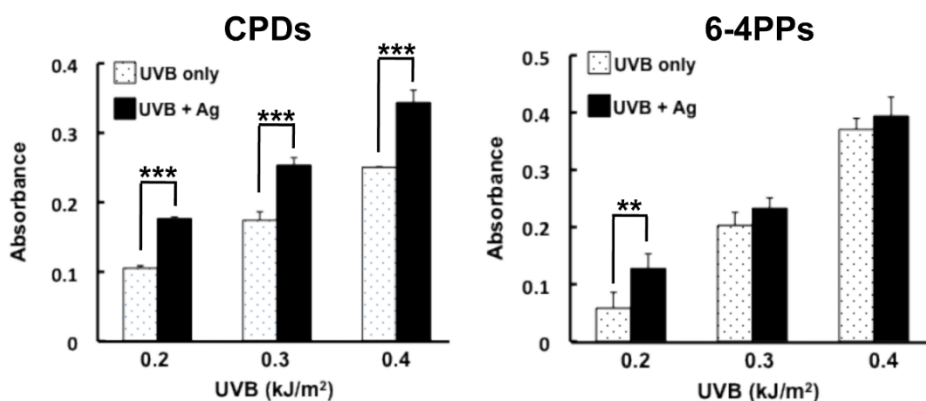


Figure 18. Generation of γ -H2AX at the site of CPDs

- (A) Cells were treated with AgNO₃ for 1 h and local-irradiated with UVC (0.1 kJ/m²). They were fixed immediately (0 h) or 1 h after irradiation and double stained with anti-CPDs and γ -H2AX. Left side images: γ -H2AX, middle images: CPDs, right side images: merged images of γ -H2AX and CPDs.
- (B) Fluorescence intensities of CPDs (0 h) and γ -H2AX foci (1 h) at the site of CPDs were measured in individual cells using Image J (ver.1.38). At least 200 foci were analyzed and each fluorescence intensity was plotted. Average fluorescence intensity of the cell population in each treatment was presented as a dot-line. * p < 0.01.

次に、AgNO₃ 存在下における UVB 照射後の CPDs および 6-4PPs の生成を、ELISA 法によって定量した (Fig. 19)。細胞に UVB と AgNO₃ を作用させると、UVB 照射量依存的に CPDs と 6-4PPs の生成量が増加し、AgNO₃ 存在下照射させると、さらに顕著な CPDs、および 6-4PPs の増加が観察された (Fig. 19A)。また、抽出した DNA に AgNO₃ を作用させ、UVB を照射したところ、細胞に作用した場合と同じ結果が示された (Fig. 19B)。

A Cellular DNA



B Cell free DNA

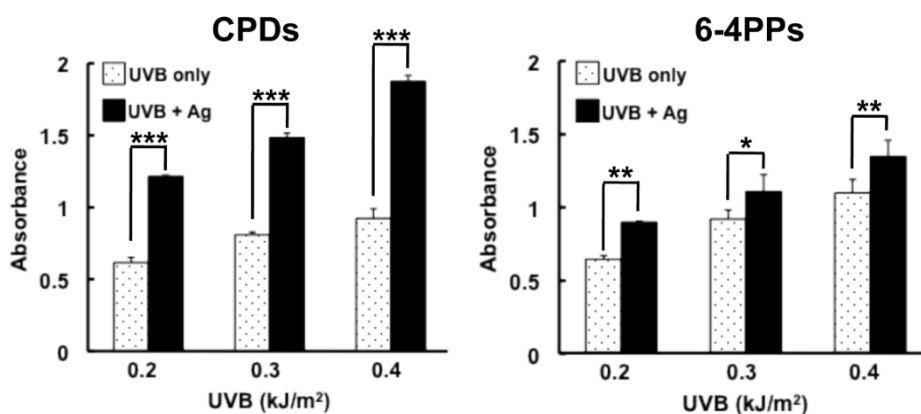


Figure 19. Determination of thymine dimers after the treatment with Ag⁺ and/or UVB

- (A) Cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for 1h and irradiated with UVB (0.2 – 0.4 kJ/m²). Cells were harvested immediately after irradiation and DNA was extracted. The formation of CPDs and 6-4PPs was quantified by ELISA, as described in the Materials and Methods.
- (B) Cellular DNA extracted from HaCaT cells was treated with AgNO₃ (50 μM) for 1 h and irradiated with UVB (0.2 – 0.4 kJ/m²). Formation of CPDs and 6-4PPs was quantified by ELISA. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

3-3-4 銀イオンと DNA の結合性

HaCaT 細胞に AgNO_3 を 0 および 1 時間作用した後、核 DNA を塩化セシウム密度勾配遠心分離により抽出した。抽出した DNA に結合した Ag^+ の濃度は ICP-AES を用いて測定した。抽出した DNA に結合した Ag^+ の濃度は、 AgNO_3 を 0 時間作用したものに比べ、1 時間作用したもののほうが有意に高かった (Fig. 20)。

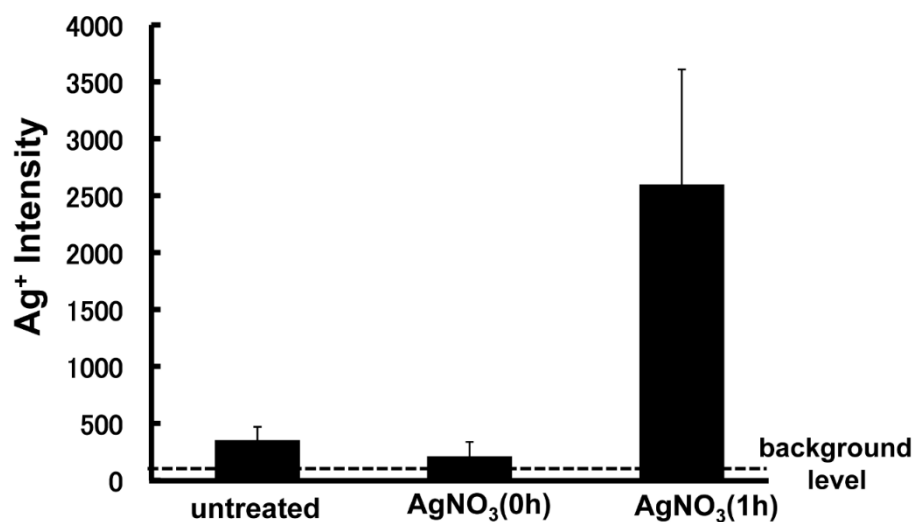


Figure 20. Detection of Ag^+ bound to cellular DNA

Cells were treated with AgNO_3 for 1 h. Cellular DNA was recovered by CsCl density gradient centrifugation, as described in the Materials and Methods. Ag^+ bound cellular DNA was detected using ICP-AES. The vertical axis shows the actual measurement value of Ag intensity. Background level means the value for a water sample. Data was represented as the mean \pm S.D. by three independent experiments.

3-4 考察

第2章において γ -H2AXの誘導を利用し、UVA照射下におけるAgNPsによるDNA損傷生成を亢進することを明らかにした。本章では、ヒト皮膚培養細胞を用いて、Ag⁺共存下、UVB照射による γ -H2AXが増加することを初めて示した。それは、UVB照射によるCPDsや6-4PPsの生成の亢進に起因していた。

Ag⁺存在下UVB照射により、CPDsおよび6-4PPsの形成が亢進する理由として、Ag⁺とDNA塩基との相互作用によるエネルギー吸収の変化が考えられる。例えば、DNA中のシトシンより、5-メチルシトシンの方がエネルギー吸収が高いため、シトシンのメチル化は著しくUVB照射後のシトシンのCPDsと6-4PPsの形成を増加させる[65,66]。シトシンのメチル化と同様に、Ag⁺と結合したピリミジンがよりUVBのエネルギーを吸収することができれば、CPDsおよび6-4PPs形成の促進をもたらす。これについては、今後詳細な検討を行う必要がある。

また、CPDsおよび6-4PPsの形成を亢進する理由として、Ag⁺とDNA塩基との相互作用によるエネルギー吸収の変化以外に、DNA立体構造の変化も考えられる。CPDs形成の頻度は、二つのピリミジンの5,6二重結合が重なる程度に依存することが知られている[67]。Ag⁺は骨格リン酸および糖に比べ、核酸塩基と優先的に相互作用する。また、Ag⁺はチミンのN(3)原子、シトシンのカルボキシルおよびグアニンとアデニンのN(7)原子と結合することができる[68]。さらに、Ag⁺は、[Ag⁺]/[nucleotide]比に応じて、DNA鎖間のATおよびGC付加物を形成する[69]。本研究では、ICP-AESを使用して、Ag⁺とDNAが相互作用することを明らかにした(Fig. 20)。従来、DNAとAg⁺の相互作用は、DNA分子の立体構造を変化することが知られている[61]ので、Ag⁺はCPDsおよび6-4PPsの形成に必要な光反応性立体構造の割合の増加を引き起こすことが可能である。また、Ag⁺と蛋白質の結合も、DNAの立体構造を変化させ、CPDsの形成を調節する可能性がある。多くの転写因子は、おそらく隣接ピリミジンの立体構造を変化させることにより、光産物の形成に影響を与えることが示されている[70,71]。例えば、TATA結合タンパク質はDNA立体構造を曲げ、6-4PPsを形成しやすくする[72,73]。CPDsの形成は*c-jun*、*c-fos*およびPCNAのプロモーター領域で増強され、特に*c-fos*のプロモーター領域で25倍増強されたことが明らかにされている[74]。本研究では、UVBを照射する前に、Ag⁺を1時間作用した。Ag⁺に対する転写タンパク質の応答およびAg⁺に結合したDNAに対する修復タンパク質の挙動は、光産物の形成の増強に寄与するかもしれない。

DNA損傷の指標として γ -H2AXを測定すると、AgNO₃の存在下でUVB照射によって誘導される γ -H2AXが増強されることが観察された(Fig. 16)。Bigniewら[75]は、UVBによって誘導される γ -H2AXは、特にS期細胞で強く見られることを示してい

る。G1、G2/M 期細胞で観察された γ -H2AX は、S 期細胞より著しく低かったが、UVB 照射量依存的であった。S 期で見られた γ -H2AX は、DNA 複製に依存して形成されたと考えられた。本研究における、 Ag^+ の存在下での UVB 照射による γ -H2AX の有意な誘導は、細胞周期とは無関係だった。複製に依存して形成した γ -H2AX と異なって、他のメカニズムが γ -H2AX の誘導に寄与することが示唆された。一つの可能性は、DNA 修復に依存して DSBs を形成することである。Hanasoge ら[76]は、 γ -H2AX が nucleotide excision repair (NER) の切開ステップによつて生成された DNA 修復中間体の蓄積によつて誘導されることを報告している。 Ag^+ は CPDs および 6-4PPs の形成を増加させるので、修復中間体は必然的に増加する。また、NER では、損傷認識に引き続いて損傷の両側で一本鎖切断を引き起こし、その結果、損傷塩基が周囲の正常塩基とともにオリゴヌクレオチドの形で切り出される。損傷部位が切り出された後に残される一本鎖のギャップにより γ -H2AX が誘導される[77]。 Ag^+ はギャップ修復を阻害する可能性も考えられる。最近の研究では、DNA- Ag^+ 複合体の光還元反応から、効率的に金属銀クラスターおよび DNA 骨格に沿って AgNPs のストリングが形成されることが示されている[78,79]。これらは、間接的に DSBs の修復阻害を介して γ -H2AX が誘導される可能性を示唆している。

CPDs および 6-4PPs の生成が増加すること、強い DSBs を誘導することは、どちらもヒトに対して深刻な影響と考えられる。これらの損傷が修復されないまま残ると、DNA 変異が誘発され、発がんにつながる。DNA 損傷部位においてはヒストン H2AX がリン酸化されると、XPA、PCNA、TFIIH 等の損傷修復タンパク質がこの部位に集積する[80]。これらはさらに、様々な修復分子を損傷部位に集積させ、DNA 修復を効率よく行うと考えられている。 Ag^+ の存在下では、これらの修復関連蛋白質をうまく集積、機能させられない可能性もある。今後、これらについて解明していきたい。

第3章の内容を Fig. 21 にまとめた。第3章においては、 Ag^+ の存在により、UVB 照射によつて形成される CPDs と 6-4PPs が増加することを明らかにした。これが起因となり、 Ag^+ の存在下における UVB 照射後の γ -H2AX の生成を亢進させた。また、 Ag^+ の存在により、DNA 損傷の修復を遅延する可能性もあると考えられた。 Ag^+ の存在が UVB による DNA 損傷生成に影響を与えることは、本論文で初めて明らかにしたものである。

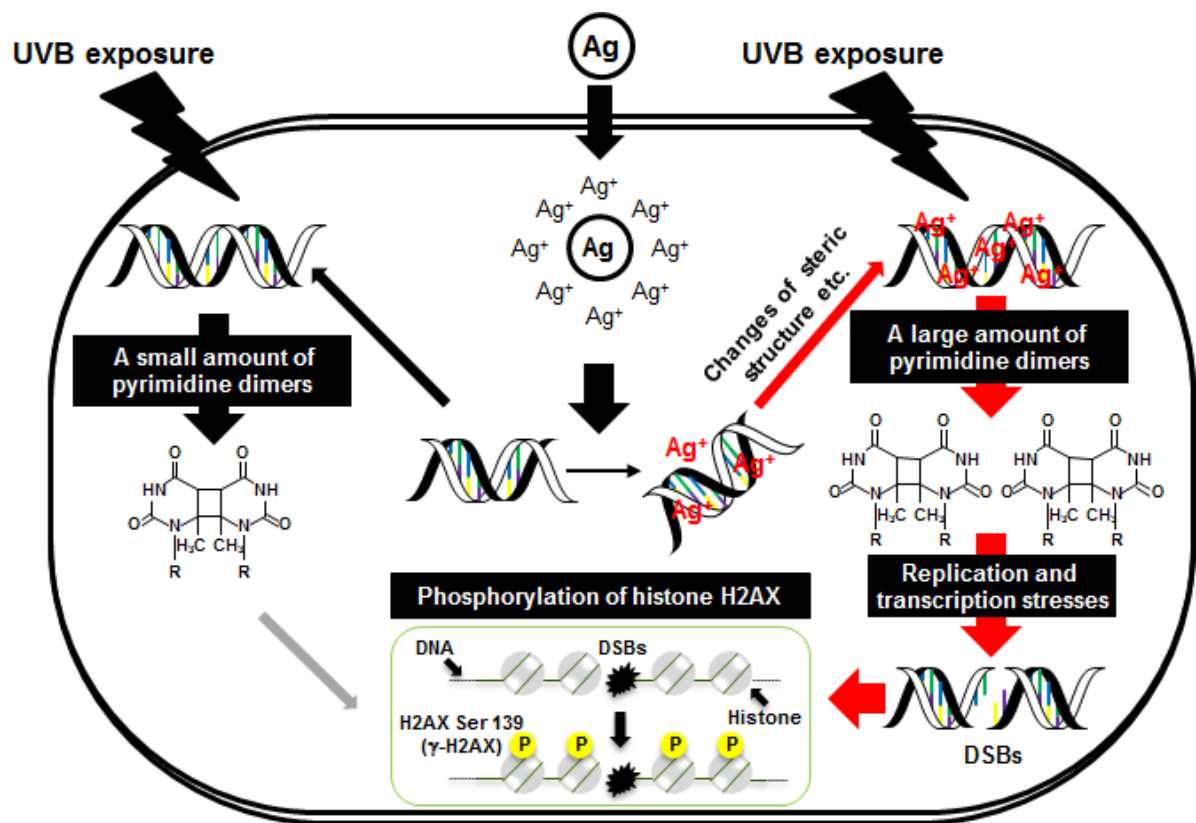


Figure 21. Ag^+ enhance UVB-induced phosphorylation of histone H2AX

第4章 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とその誘導メカニズム

4-1 序論

第2および3章において、UV、AgNPs それぞれ単独作用により誘導される DNA 損傷が、両者の複合曝露により増加することを明らかにした。DNA 損傷を亢進する理由として、Ag⁺と DNA の結合による UV 吸収の変化や、Ag⁺と蛋白質の結合による細胞内酸化が考えられる。一方、AgNPs により DNA のクロマチン構造が変化し、UV に対する感受性が変化する可能性も視野に入れなければならない。

真核生物のゲノム DNA は、細胞核内でクロマチンとよばれる蛋白質複合体として高度に折りたたまれて存在する[27]。近年、よく注目されているヒストンはクロマチンを形成する構造タンパク質である。ヒストンの N 末端を構成する 20~30 のアミノ酸は立体構造に乏しく、ヒストンテールと呼ばれ、アセチル化、メチル化、リン酸化など、様々な修飾を受け、ヒストンと DNA の相互作用に影響を及ぼし、クロマチン構造が変化する。ヒストンタンパクはリジン、アルギニンの含有量が多い塩基性タンパクであることから、通常はヒストン全体が酸性の DNA と親和性を持つ。ここで、ヒストンのリジン・アルギニンのアミノ末端がアセチル化すると、電荷が中和されることでヒストンと DNA の相互作用が弱まり、クロマチン構造が弛緩し、露出した DNA が増加することが報告されている[26]。そこに、UV 照射されると、DNA 損傷生成率を変化させる可能性が予想される。一方、クロマチン構造の変化と DNA 損傷修復にも密接な関係がある[80]。損傷した DNA を修復するにはクロマチン構造を緩め、そこに DNA 修復に XPA、PCNA、TFIIH 等の必要な蛋白質を接近させる必要がある。よって、ヒストン修飾における DNA クロマチン構造の変化は、DNA 損傷修復に対して重要な役割を果たしているかもしれない。

そこで、本章では、AgNPs によるヒストン H3 の化学修飾の変化について検討した。その結果、ヒストン H3 10 番目のセリンのリン酸化が強く、また持続的に誘導されることが明らかになったので、そのメカニズムを解析した。

4-2 実験材料および方法

4-2-1 実験材料

第2章 2-2-1 に示したヒト皮膚細胞 HaCaT、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 およびヒト乳癌細胞 MCF-7 を用いた。また、第1章 1-2-1 に示した銀粒子 (<0.1 μm 、2 – 3.5 μm 、5 – 8 μm 、<45 μm および <106 μm) を使用した。

4-2-2 細胞の培養

第2章 2-2-2 に示したように HaCaT、A549 および MCF-7 細胞を培養した。

4-2-3 銀粒子作用

細胞は実験前日に 0.5% FBS を含む DMEM 培地に培地を交換し、実験当日にさらに交換した。実験当日は、第1章 1-2-2 に示したように AgNPs、AgNO₃ および UVA 照射 (AgNPs (UVA)) または H₂O₂ 酸化 (AgNPs (H₂O₂)) された AgNPs (0.1 – 1 mg/mL) を 0 – 24 時間作用させた。

AgNPs の取り込みを阻害するため細胞に 10 mM sodium azide (NaN₃) および 50 mM 2-deoxyglucose (2-DG) を、リリースした Ag⁺ を除去するため 20 mM NAC を、アクチンの脱重合を阻害するため Phalloidin (Pha; 0 – 100 μM) (Wako Pure Chemicals Ind., Japan) を、アクチンの重合を阻害するため、LatrunculinB (LatB; 0 – 100 μM) (Wako Pure Chemicals Ind., Japan) または Cytochalasin B (CCB; 0 – 20 μM) を、Aurora kinase B (AURKB) の活性を阻害するため ZM 447439 (ZM; 5 μM) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を、それぞれを 30 分前に作用させた。

4-2-4 ウェスタンブロット法による p-H3S10、G-actin および p-AURK の検出

G-actin および p-AURK を検出するため、銀粒子作用した後、細胞を回収し、0.1 mL MS Buffer を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、遠心分離し上清を試料として回収した。p-H3S10 を検出するため、銀粒子作用した後、細胞を回収し、第2章 2-2-5 に示したように前処理した。その後、第2章 2-2-5 と同様に、Western blotting によって p-H3S10、G-actin および p-AURK の検出を行った。

p-H3S10 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-phospho-Histone H3 (Ser10) clone 3H10 (rabbit polyclonal) (Millipore, MA, USA)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

Ac-H3K9、K14 および Total-Ac-H3 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9 or 14, Total) (rabbit polyclonal) (Millipore, MA, USA)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

Tri-Me-K4、K27 および Di-Me-H3K9 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-di- or tri-methyl-Histone H3 (Lys4, 9 or 27) (mouse polyclonal) (Monoclonal antibody labo., Japan)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

G-actin 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体：Anti-actin (C-11) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

p-AURK 検出のための一次および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体: Phospho-Aurora A (Thr288)/Aurora B (Thr232)/Auroa C (Thr98) (D13A11) XP™ Rabbit mAb および Aurora B/AM1 Antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA)

二次抗体：Peroxidase-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Labo., PA, USA)

4-2-5 免疫染色法による p-H3S10 および F-actin 像の検出

第 2 章 2-2-6 と同様に、免疫染色法によって p-H3S10 および F-actin の検出を行った。p-H3S10 検出のための一次および二次抗体は、4-2-4 に示した抗体を使用した。また、F-actin 検出のために、Anti-stain™ 555 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, CO, USA) を使用した。

4-2-6 細胞内への銀粒子の取り込み量の測定

実験前日 80% コンフルエントの状態になった各細胞に銀粒子 (0–1 mg/mL) を 1 時間作用させた。その後、細胞をトリプシンで回収、懸濁し、第 2 章 2-2-8 に示したように細胞内の銀粒子の取り込み量を FCM を用いて測定した。

4-2-7 グルタチオン量の測定

第 1 章 1-2-8 と同様に細胞内 GSH 量を測定した。

4-2-8 FCM による F-actin 量の検出

FCM を用いて A549 細胞に対する AgNPs 作用後における細胞内 F-actin 量の検出を行った。処理した A549 細胞をトリプシンで回収し、3.7% formalin で 15 分間に固定した。FCM 用溶液 (0.2% TritonX-100, 1% BSA) で 3 回洗浄後、FCM 用溶液によって

1/500 に希釈した Anti-stain™ 555 Fluorescent Phalloidin を 25°C で 1 時間反応させた後、FCM 用溶液で 3 回洗浄した。FCM 用溶液で 1mL に調製したサンプルを添加した。FCM によって、555 Fluorescent Phalloidin の蛍光を測定した。

4-2-9 Cofilin 1 ノックアウト細胞の作製

Stealth RNAi™ siRNA target human Cofilin 1 (oligo ID: HSS141560; HSS141561; HSS173851) および Negative control siRNA は、Life Technologies 社から購入した。A549 細胞は、35 mm dish に播き、第 2 章 1-1-2 に示したように培養し、30% コンフルエントになった時、RNAi MAX トランス試薬 (Life Technologies Co., Japan) を使用して、siRNA を細胞に 0.1 nM になるようにトランスフェクトした。さらに、細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した後、10% FBS を含む DMEM 培地に培地を交換した。24 時間後、0.5% FBS を含む DMEM 培地に培地を交換し、さらに 24 時間培養した。実験当日に dish に 80% コンフルエントの状態になるように調整した。

また、ノックダウン効率を確認するため、Cofilin 1 の mRNA 発現量を測定した。RNA は total RNA isolation kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany) を用いて抽出した。抽出した RNA は PrimeScript® RT reagent kit (Takara, Japan) を用いて complementary DNA (cDNA) に逆転写した。その後、SYBR Green PCR Master Mix (Roche Applied Science, Germany) を用いて LightCycler® Nano System (F. Hoffmann-La Roche, Switzerland) で、リアルタイム PCR 反応を行った。95°C、10 分 → 95°C、10 秒 → 60°C、10 秒 → 72°C、15 秒 → 95°C、30 秒 → Melting curve from 60°C → 95°C の通りで PCR を設定した。使用した Primer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) は以下の通りである。

Cofilin 1: 5'-GGTGCTCTTCTGCCTGAGTG-3'; 5'-TCTTGACAAAGGTGGCGTAG-3'
GAPDH: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'; 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

4-2-10 がん原遺伝子発現の検出

がん原遺伝子 *c-fos*、*c-jun* の mRNA 発現量は 4-2-9 と同様に検討した。使用した Primer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) は以下の通りである。

c-jun: 5'-TGCCTCCAAGTGCCGAAAAA-3'; 5'-GACTTTCTGTTAAGCTGTGCC-3'
c-fos: 5'-CGGGCTTCAACGCAGACTA-3'; 5'-GGTCCGTGCAGAAGTCCTG-3'
GAPDH: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'; 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

4-2-11 クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation; ChIP) 法

(1) Primer の設計法

目的遺伝子 *c-jun* のプロモーターの配列情報は DBTSS (Data Base of Transcriptional Start Sites) から入手した。Primer の設計はフリーの Primer 設計ソフトである Primer 3 を利用した。*c-jun* 遺伝子の転写開始点を基準として、-1000 bp、-80 bp、+150 bp、+1000 bp、+2000 bp の地点の Primer を設計した。DBTSS を使って所得した塩基配列を Primer 3 に入力し、プロダクトサイズが 150 bp 以下となるように条件を設定して Primer を設計した。設計した Primer は Operon 社に注文した。設計した Primer を以下に示した。

-1000 F: 5'-GCGTGTTGTGTTAAGCGTGT-3'; R: 5'-CTCGGAGGGGCAGTTTTTAT-3'
-80 F: 5'-GCGACGCGAGCCAATG-3'; R: 5'-AGCCCGAGCTCAACACTTATCT-3'
+150 F: 5'-GGCAGACAGACAGACACAGC-3'; R: 5'-GAGACCAGGCTCTCTGGACA-3'
+1000 F: 5'-GCAGCCCAAACCTAACCTCAC-3'; R: 5'-CAGGGTCATGCTCTGTTTCA-3'
+2000 F: 5'-CAGGTGGCACAGCTTAAACA-3'; R: 5'-TTTTTCTCTCCGTCGCAACT-3'

(2) クロマチンの断片化

100 mm dish に A549 細胞を播き、第 2 章 2-2-3 に示したように細胞を培養した。細胞に 4-2-3 を示したように AgNPs を作用させた後、トリプシン処理により細胞を回収した。細胞数をカウントし、細胞数が 5.0×10^6 となるように調整した。3000 rpm、3 分間の遠心により細胞を落とした後上清を捨て、FACS buffer (2% FBS、0.1% NaN_3 となるように PBS で調製したもの) を 10 mL 加えた。11×固定液 (formaldehyde 溶液 (37%) を 11% 濃度となるように FACS buffer で希釈) を 1 mL 加え室温 8 分間反応させた。その後、1 mL グリシンを加え固定反応を停止させた後、1300 rpm、5 分間遠心後、上清を捨て 4°C で 10 分間シェイカーにかけた。再度 1300 rpm、5 分間遠心後、上清を捨て、ペレットにプロテアーゼ阻害剤 (F. Hoffmann-LaRoche, Switzerland) を含む SDS 溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、1% SDS) を加えピペッティングによりシングルセルにした。全量をシリコナイズドチューブ (Watoson, Japan) に移した後、氷上で 10 分間静置した。密閉式超音波破碎機で 30 秒超音波処理を 7 回行い、クロマチンを断片化した。2000 rpm、8 分間遠心し、上清を新しいシリコナイズドチューブに移した。

(3) クロマチン免疫沈降過程

クロマチン免疫沈降過程は One day ChIP kit (Nippon gene, Japan) を使用した。断片化クロマチン 132 μL に当たり、ChIP 希釈 buffer を 484 μL 加え混合し、出来た溶液を新しいシリコナイズドチューブ 2 本に 280 μL ずつ分注し、もう 1 本の新しいシリコナイズドチューブには 28 μL 分注し、これは Input 用として -80°C で保存した。一方のチューブはキット付属の IgG を 2 μL 、もう一方のチューブには Anti-phospho-Histone

H3 (Ser10) (rabbit polyclonal) を 2 μ L 加え、キャップロックをして一晩 4°C にてローテーターで攪拌した。次の日、12000 rpm、10 分間遠心した後、上清を ChIP buffer を用いて洗浄を行った Sepharose ビーズ入りのチューブに移し攪拌した後、4°C にて 30 分間ローテーターで振盪した。また、-80°C で保存しておいた Input から DNA を抽出するために 150 μ L の ethanol を加えて 10 分間静置後、10000 rpm、10 分間遠心した。遠心終了後上清を除き、風乾させておいた。30 分の振盪が終わったら、1 mL の ChIP buffer を加えて混合した後、3000 rpm、2 分間の遠心にかけた。上清を除いた後、再度 1 mL の ChIP buffer を加えてサスペンドし、新しく用意した 15 mL チューブに予め 8 mL の ChIP buffer を加えて置いたものに全量移した。氷上で 5 分間静置させた後、2000 rpm、3 分間遠心し、上清を残り 1 mL まで捨てた後、残り 1 mL を新しいシリコナイズドチューブに移した。再度 3000 rpm、2 分間遠心後上清を完全に除き、ここに Purifying slurry を 100 μ L 加えた。キャップロックをして 10 分間ボイルした後、proteinase K を 1 μ L 添加した。これを 55°C のサーモミキサーにかけ 30 分シェイクした。30 分後再度 10 分間ボイルした後、12000 rpm、1 分間遠心し、70 μ L 上清を新しいチューブに移した。さらに、残りの液に H₂O を 130 μ L 加えて、攪拌にかけた。ここから、130 μ L 取り先ほどのチューブに移した。この液中には精製された DNA が含まれており、-20°C で冷凍保存した。

(4) リアルタイム PCR

4-2-11 (1) で設計した Primer および Master Mix (5 μ L ChIP DNA、10 μ L Master Mix (Taq)、2 μ L Forward and reverse primer mix (each 0.2 μ L) と 3 μ L H₂O を混合したもので混合し、反応液を作製、8 連チューブ (F. Hoffmann-La Roche, Switzerland) に 15 μ L ずつ分注した。次に、精製した DNA を 5 μ L ずつ加え、軽く攪拌した後、卓上型遠心機でスピンドウンした。4-2-9 に示したように同様の設定でリアルタイム PCR 反応を行った。使用した各 Primer を 4-2-11 (1) Primer の設計法に示した。検量線は Input を 10、30、100 倍希釈したサンプルを利用して作成し、その検量線より ChIP サンプルの初期鋳型量を算出した。なお、Primer ごとの増幅効率 (AE) を次の式から求めた。

$$AE = 10^{(-1/\text{検量線の傾き})}$$

特定ゲノム領域の p-H3S10 亢進については Input の値を基準として %Input として算出した。%Input を求める式は以下の通りである。

$$\%Input = AE^{(Ct_{Input} - Ct_{ChIP})} \times 100\%$$

なお、Ct_{Input} と Ct_{ChIP} は Real-time PCR の結果得られたスレッシュホールド値であり、LightCycler nano software 1.0 の Automatic Quantification により算出した。

4-2-12 検定

第1章 1-2-9と同様に有意差検定を行った。統計的な有意性は、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で表した。

4-3 実験結果

4-3-1 銀ナノ粒子によるヒストン H3 のリン酸化

AgNPsによるヒストン H3 各修飾の変化を Fig. 22A に示す。特に大きな変化があったのは、ヒストン H3 10 番目のセリンのリン酸化 (p-H3S10) で、強くまた持続的に誘導された。ヒストン H3 9 番目、14 番目のリジンおよび Total のアセチル化 (Ac-H3K9、Ac-H3K14 および Total-Ac-H3 それぞれ) については、AgNPs 作用 2 時間以後低下した。ヒストン H3 4 番目のリジンのトリメチル化 (Tri-Me-H3K4) は、アセチル化と同じ傾向が認められた。さらに、ヒストン H3 9 番目のリジンのジメチル化 (Di-Me-H3K9) は、AgNPs 作用後 2 時間から強く誘導されたが、ヒストン H3 27 番目のリジンのトリメチル化 (Tri-Me-H3K27) は、有意な変化が観察されなかった。以下の実験は AgNPs による p-H3S10 に着目し、p-H3S10 の誘導メカニズムを詳細に解明した。

HaCaT、A549 および MCF-7、それぞれ各細胞に AgNPs を 1 時間作用した後、Western blotting によって p-H3S10 の検出を行った (Fig. 22B)。p-H3S10 は、AgNPs の作用濃度依存的に誘導された。p-H3S10 の強度は、MCF-7 > A549 > HaCaT である。第 2 章において、HaCaT 細胞より A549 および MCF-7 細胞内に AgNPs の取り込み量が多かったことを明らかにした (Fig. 10A)。このことから、細胞株の違いによる p-H3S10 の誘導の違いは、 γ -H2AX の生成と同様に細胞内の AgNPs の取り込み量に関連していると考えられた。

環境中に放出された AgNPs の主要なターゲットは、ヒトの肺および皮膚と考えられる。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 における、AgNPs によって誘導される p-H3S10 の免疫染色像を Fig. 22C に示す。未処理細胞の多くは p-H3S10 がほとんど見られないが、有糸分裂期に特徴的な染色体構造を示す細胞においてのみ非常に強い p-H3S10 の誘導が見られた (Fig. 22C①)。一方、AgNPs 作用細胞では、ほぼ全ての細胞において核内全体が均一に染まっている像が観察された。この染色のされ方から、細胞核全体がリン酸化されていることが考えられ、有糸分裂に伴うリン酸化とは異なることが示された (Fig. 22C② and ③)。

さらに、AgNPs による誘導される時間依存的な p-H3S10 の変化を検討した (Fig. 22D)。A549 および HaCaT 細胞に AgNPs を作用すると、p-H3S10 が作用直後から 24

時間まで持続的に引き起こされた。以上の結果より、AgNPsは有糸分裂と異なったp-H3S10を持続的に誘導することを明らかにした。

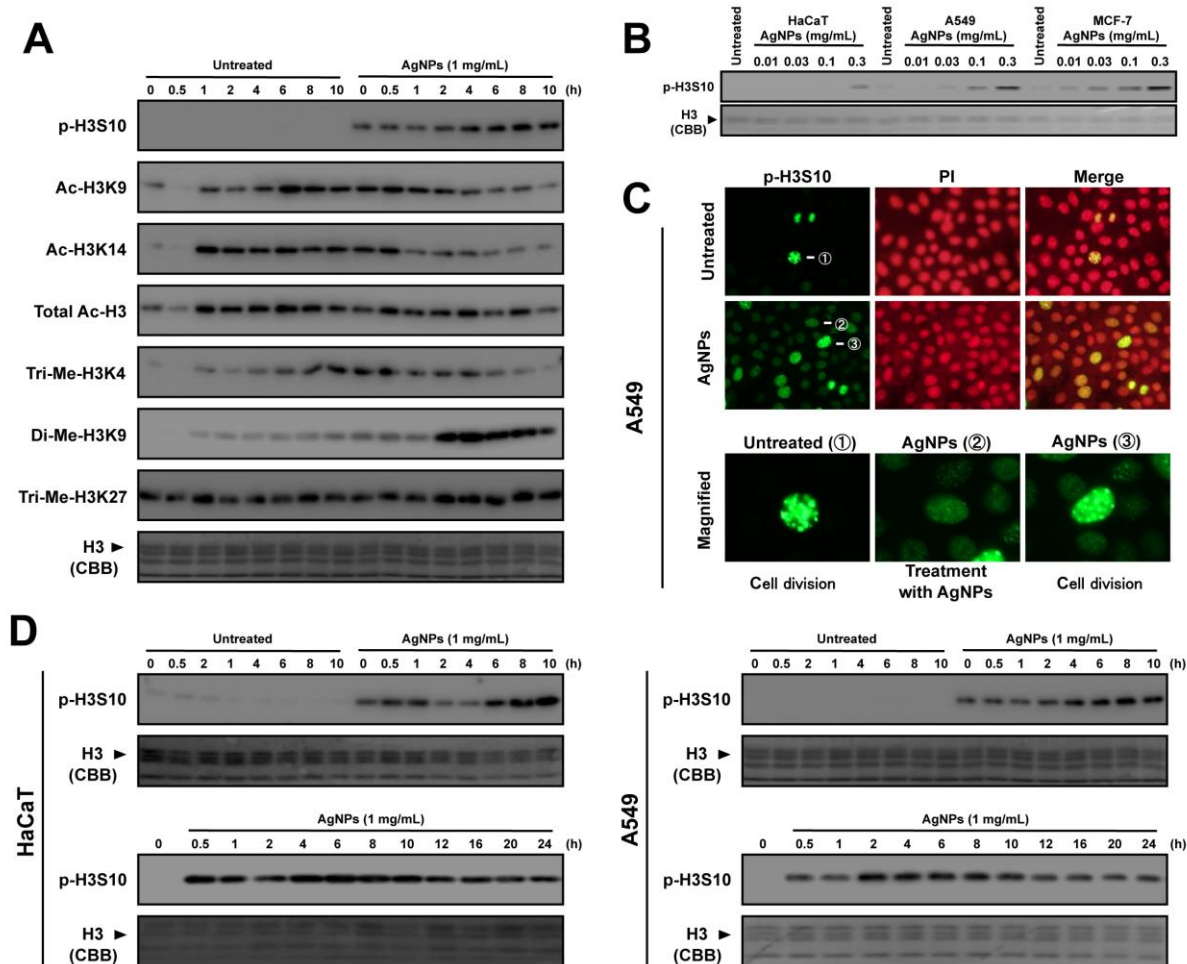


Figure 22. Histone modifications after the treatment with AgNPs.

- (A) Time-dependent histone modifications after the treatment with AgNPs. A549 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL). The nuclear fraction was extracted and western blotting was carried out using several antibodies for modified histones. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (B) p-H3S10 after treatment with AgNPs. HaCaT, A549 and MCF-7 cells were treated with AgNPs (0 – 0.3 mg/mL) for 1 h. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (C) Images of p-H3S10 after treatment with AgNPs. A549T cells treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h were stained with the antibody for p-H3S10 and PI. Left side images: p-H3S10; middle images: PI staining; right side images: merged images of p-H3S10 and PI. Numbered cells (① – ③ in right panels) are shown as magnified images in left panels.
- (D) p-H3S10 after treatment with AgNPs. HaCaT and A549 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for ~24 h. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

4-3-2 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と細胞内取り込み量の関連性

AgNPs による p-H3S10 の誘導と細胞内の AgNPs 取り込みとの関係を明確するために、HaCaT および A549 細胞を用いて、AgNPs の作用濃度を変えて実験を行った (Fig. 23)。2 つの細胞株において、AgNPs で 1 時間作用した後、SS 強度は AgNPs の作用濃度依存的に増加した (Fig. 23A)。また、p-H3S10 の誘導は AgNPs の作用濃度依存的であった (Fig. 23B)。

次に、第 2 章で用いた 5 種の異なるサイズの銀粒子を用いて実験を行った (Fig. 23C)。SS 強度の変化から、直径が $< 0.1 \mu\text{m}$ および $2 - 3.5 \mu\text{m}$ の粒子は、HaCaT および A549 細胞内に取り込まれた。 $5 - 8 \mu\text{m}$ 以上の粒子では細胞内に取り込まれなかった。取り込まれた AgNPs および $2 - 3.5 \mu\text{m}$ の銀粒子の SS 強度の増加に伴い p-H3S10 が増強した (Fig. 23D)。これらの結果より、小さいサイズの銀粒子、特にナノ粒子は、細胞内に取り込まれると p-H3S10 を誘導することが示された。

AgNPs の取り込みは p-H3S10 にどのように影響するかをさらに調べるため、取り込み阻害剤である NaN_3 および 2-DG を用いて検討を行った。阻害剤の前処理によって、細胞内の AgNPs の取り込み量が抑制された (Fig. 23E)。また、このときの AgNPs による p-H3S10 の誘導は、阻害剤の前処理によって抑制された (Fig. 23F)。以上の結果により、AgNPs による p-H3S10 の誘導は AgNPs の取り込みに強く依存していることが確認された。

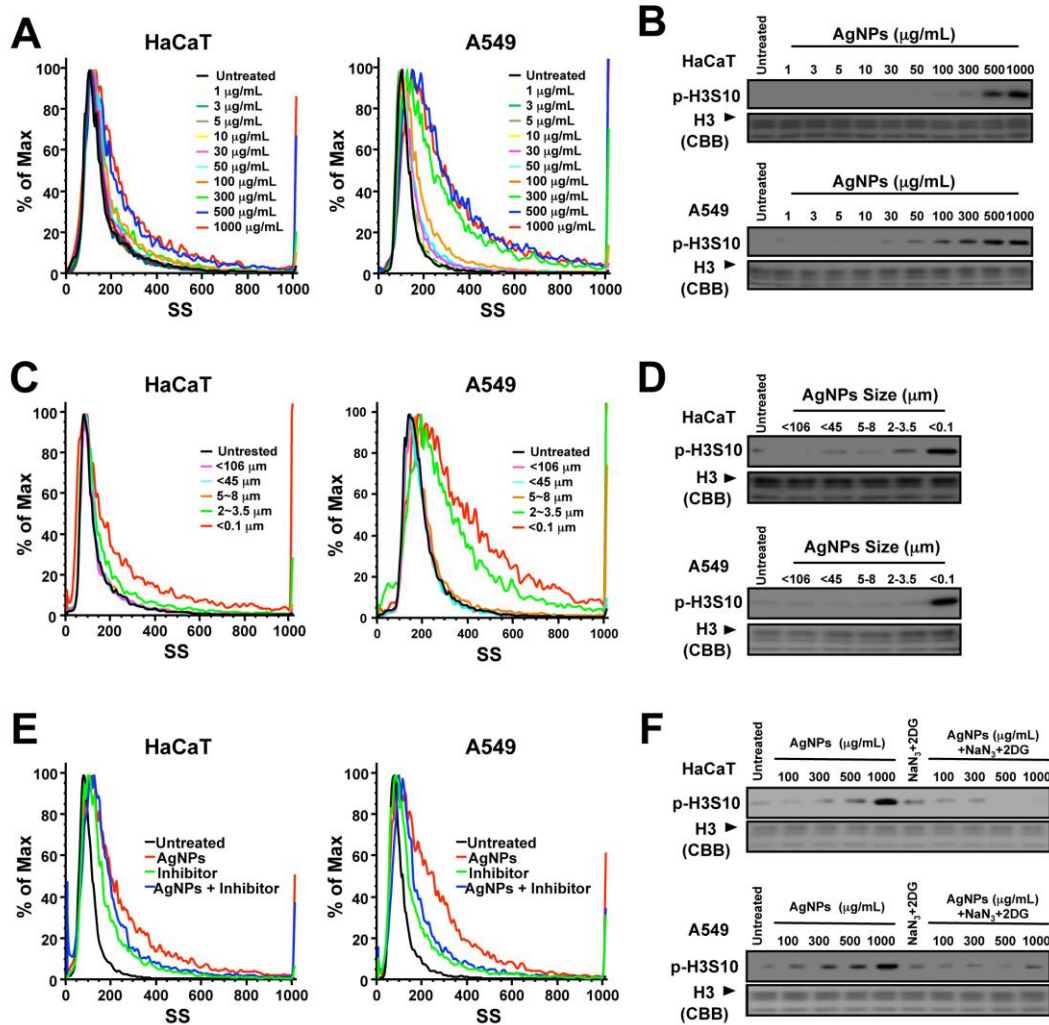


Figure 23. Incorporation of Ag particles into cells, and subsequent p-H3S10

HaCaT and A549 cells were treated with several doses (0 – 1 mg/mL) of AgNPs for 1 h.

- (A) Intercellular uptake of AgNPs. HaCaT and A549 cells were treated with several doses (0 – 1 mg/mL) of AgNPs for 1 h. FS and SS were analyzed using FCM.
- (B) p-H3S10 after treatment with AgNPs. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (C) Intercellular uptake of Ag particles. HaCaT and A549 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) of different sizes (< 0.1 μm , 2 – 3.5 μm , 5 – 8 μm , < 45 μm and < 106 μm) for 1 h. FS and SS were analyzed using FCM.
- (D) p-H3S10 after treatment with Ag particles. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (E) Intercellular uptake of AgNPs in the presence of endocytosis inhibitors. HaCaT and A549 cells were treated with AgNPs in the presence of 10 mM NaN_3 and 50 mM 2-DG to inhibit endocytosis. SS was analyzed using FCM.
- (F) p-H3S10 in the presence of endocytosis inhibitors. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

4-3-3 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と銀イオンの関連性

次に、AgNPs の細胞内の Ag⁺ のリリースと p-H3S10 の関係を検討した (Fig. 24)。初めに、AgNO₃ 作用による p-H3S10 の誘導について検討した。AgNO₃ は、作用後 1 時間近辺で p-H3S10 を起こしたが、それ以後は持続しなかった (Fig. 24A)。また、NAC の前処理による Ag⁺ 除去によって、AgNPs による p-H3S10 は抑制された (Fig. 24B)。その際、NAC は細胞内に AgNPs の取り込みに影響を与えなかった (Fig. 24C) ことから、AgNPs による p-H3S10 の持続的な誘導は、細胞内に取り込まれた AgNPs から Ag⁺ が連続的に放出することが重要であると考えられた。

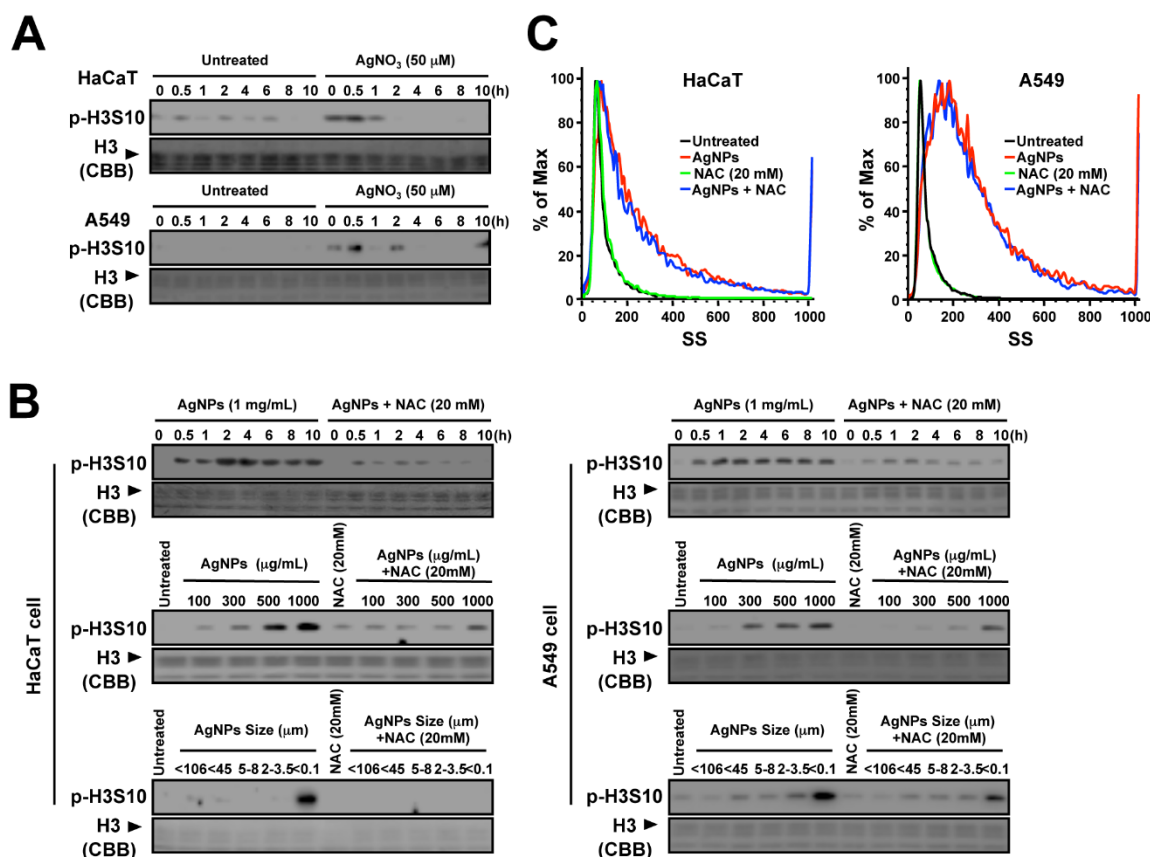


Figure 24. Release of Ag ions from AgNPs and p-H3S10

- (A) p-H3S10 after treatment with AgNO₃. HaCaT and A549 cells were treated with AgNO₃ (50 μM) for 10 h. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (B) p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of NAC (20 mM). HaCaT and A549 cells were treated with NAC for 0.5 h and treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h.
- (C) Intercellular uptake of AgNPs in the presence of NAC (20 mM). HaCaT and A549 cells were treated with NAC for 0.5 h and treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h. The cells were analyzed using SS in FCM.

次に、AgNPsによるp-H3S10の誘導と、細胞内でAgNPs表面からリリースしたAg⁺との関係を明確するために、第1章で通常状態のAgNPs表面からリリースしたAg⁺よりリリース量が大幅に増加したUVAおよびH₂O₂によって酸化されたAgNPsを用いて実験を行った (Fig. 25)。通常状態のAgNPsに比べ、UVAおよびH₂O₂を処理したAgNPsでは、より強いp-H3S10の誘導が認められた (Fig. 25A)。また、粒子表面の酸化状態の違いによって、細胞への取り込み量に変化がないことを確認した (Fig. 25B)。

さらに、GSH assayを用いて、細胞内のAgNPsから放出されるAg⁺の量を調べた (Fig. 25C)。通常状態のAgNPsに比べ、UVAおよびH₂O₂を処理したAgNPsでは、よりGSHレベルの減少が観察された。これらの結果から、p-H3S10はAg⁺によって引き起こされることが再確認された。また、細胞内にAgNPsからAg⁺が持続的にリリースすることは、AgNPsの取り込み後、長時間にわたりp-H3S10が誘導されることに寄与していると考えられた。

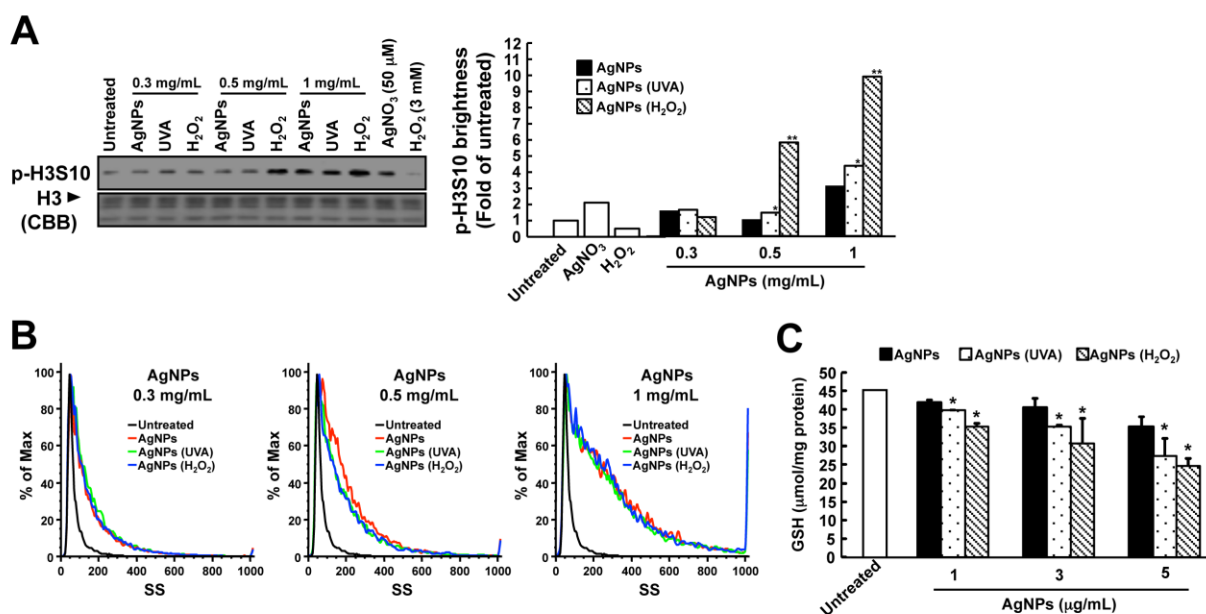


Figure 25. p-H3S10 after treatment with oxidized AgNPs

A549 cells were treated with AgNPs (0.3, 0.5 and 1 mg/mL) pre-exposed to UVA (50 kJ/m², peak: 369 nm) or 1 M H₂O₂ for 1 h.

- (A) p-H3S10 after the treatment with oxidized AgNPs. H3 (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE. The western blotting bands were determined using Image J version 1.38 and the data are represented as a ratio to the untreated control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.
- (B) Intercellular uptake of oxidized AgNPs, SS was analyzed by FCM.
- (C) Intracellular GSH after treatment with oxidized AgNPs. The amount of intracellular GSH was determined by the GSH assay. Values were corrected based on the results of the protein assay. **p* < 0.05.

4-3-4 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とアクチンフィラメントの関与

これまでに、AgNPs による p-H3S10 には、AgNPs が細胞内に取り込まれ、そして、その後の AgNPs 表面から Ag⁺をリリースすることが必須であると明らかにした。しかし、AgNPs による p-H3S10 の分子メカニズムはまだ不明である。Greulich ら[81]は、細胞はマクロピノサイトーシスおよびクラスリン依存性エンドサイトーシスによって AgNPs を取り込むことを報告した。一方、細胞内で最も豊富に存在するアクチン蛋白質から構成されるアクチン細胞骨格が、細胞の形態維持や細胞運動に必要な構造であることは広く知られている。分子量が約 42 Kb の球形アクチンは G-actin と呼ばれ、G-actin が多数重合した糸状の重合体は F-actin と呼ばれる。これらの重合と脱重合の繰り返しによってエンドサイトーシスが制御されていることが報告されている [82]。そこで、AgNPs による p-H3S10 がアクチン重合および脱重合に関連しているかどうか検討した。

AgNPs 作用後 24 時間までの細胞内 G-actin 量の変化を Fig. 26A に示した。AgNPs 作用直後から、G-actin の量は 2、8 および 16 時間時点をピークに時間依存的な増加を示した。また、AgNPs 作用 1 時間後、濃度依存的に G-actin の量が増加した。よって、AgNPs 作用は、アクチンの脱重合を亢進させることが示唆された。さらに、AgNPs 作用 1 時間後の細胞内 F-actin の動態を検討した。まず、FCM を用いて、AgNPs 作用後の細胞内 F-actin の量を検出した。細胞内 F-actin の量は、AgNPs の作用濃度依存的に減少した (Fig. 26B)。また、AgNPs 作用 1 時間後、未作用細胞では、きれいな糸状 F-actin が観察されたが、AgNPs の作用濃度依存的な F-actin の崩壊が認められた (Fig. 26C)。これらの結果から、AgNPs によりアクチンが脱重合することが確認された。

次に、アクチンの重合および脱重合阻害剤を用いて、アクチンの重合および脱重合を阻害した時、AgNPs による p-H3S10 の誘導が阻害されるかどうかを検討した。まず、アクチン重合阻害剤 LatB および脱重合阻害剤 Pha 作用後の細胞内 G-actin の量を Fig. 27A に示した。LatB の前作用では、アクチンの重合を阻害し、細胞内 G-actin の量が上昇した。それに対して、Pha の前作用では、細胞内 G-actin の量が低下した。また、Pha の前作用によって、Pha の作用濃度依存的に AgNPs による誘導される p-H3S10 が抑えられた (Fig. 27B)。さらに、LatB および同じアクチンの重合阻害剤である CCB の前作用によっても、AgNPs による誘導される p-H3S10 が抑制された (Fig. 27C)。また、免疫染色を用いて、LatB および Pha の前作用によって、p-H3S10 誘導が阻害されることを確認した (Fig. 27D)。

次に、阻害剤の前作用によって、AgNPs の細胞内への取り込み量に変化するが否かを調べた (Fig. 27E)。SS 強度は AgNPs の作用濃度依存的に増加したが、CCB の前作用によって影響されなかった。

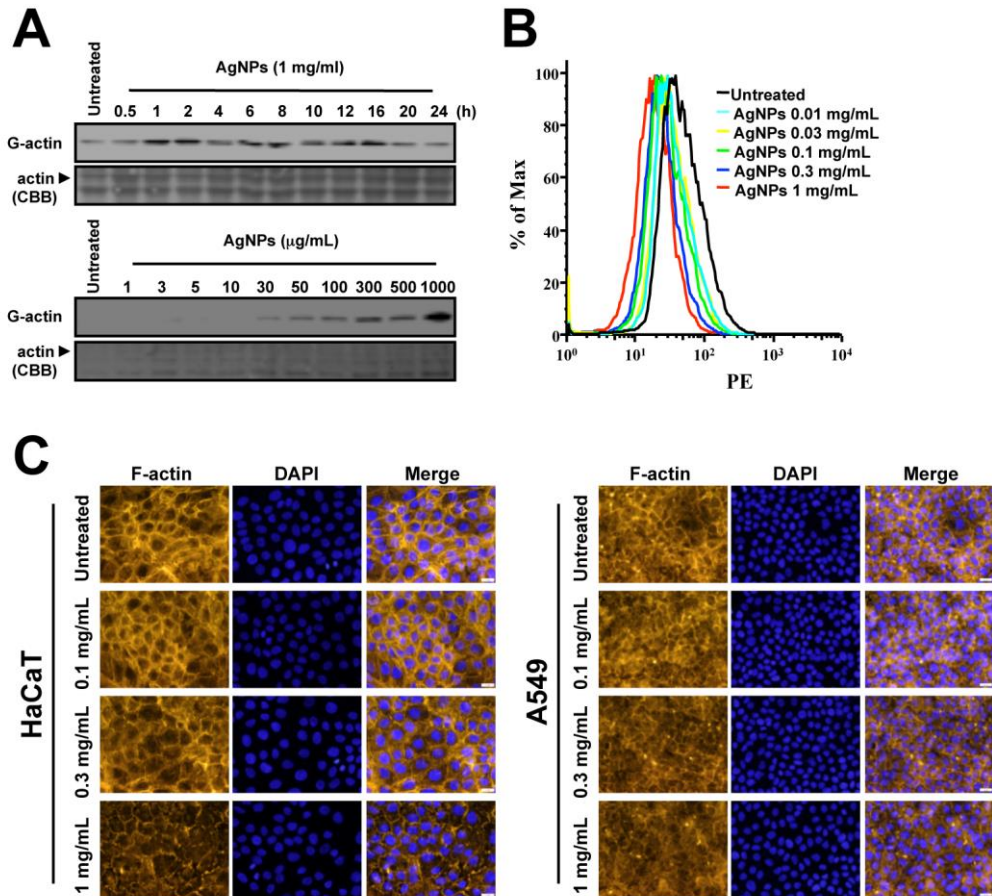


Figure 26. Depolymerization of actin after treatment with AgNPs

- (A) Release of G-actin after treatment with AgNPs. A549 cells were treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 0 – 24 h. Actin (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (B) Depolymerization of F-actin after treatment with AgNPs. A549 cells were treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h, and stained with Anti-stain™ 555 Fluorescent Phalloidin for F-actin. The depolymerization of F-actin were analyzed using FCM.
- (C) Images of F-actin after treatment with AgNPs. HaCaT or A549 cells treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h were stained with the Anti-stain™ 555 Fluorescent Phalloidin for F-actin and DAPI. Left side images: F-actin, middle images: DAPI staining, right side images: merged images of F-actin and DAPI.

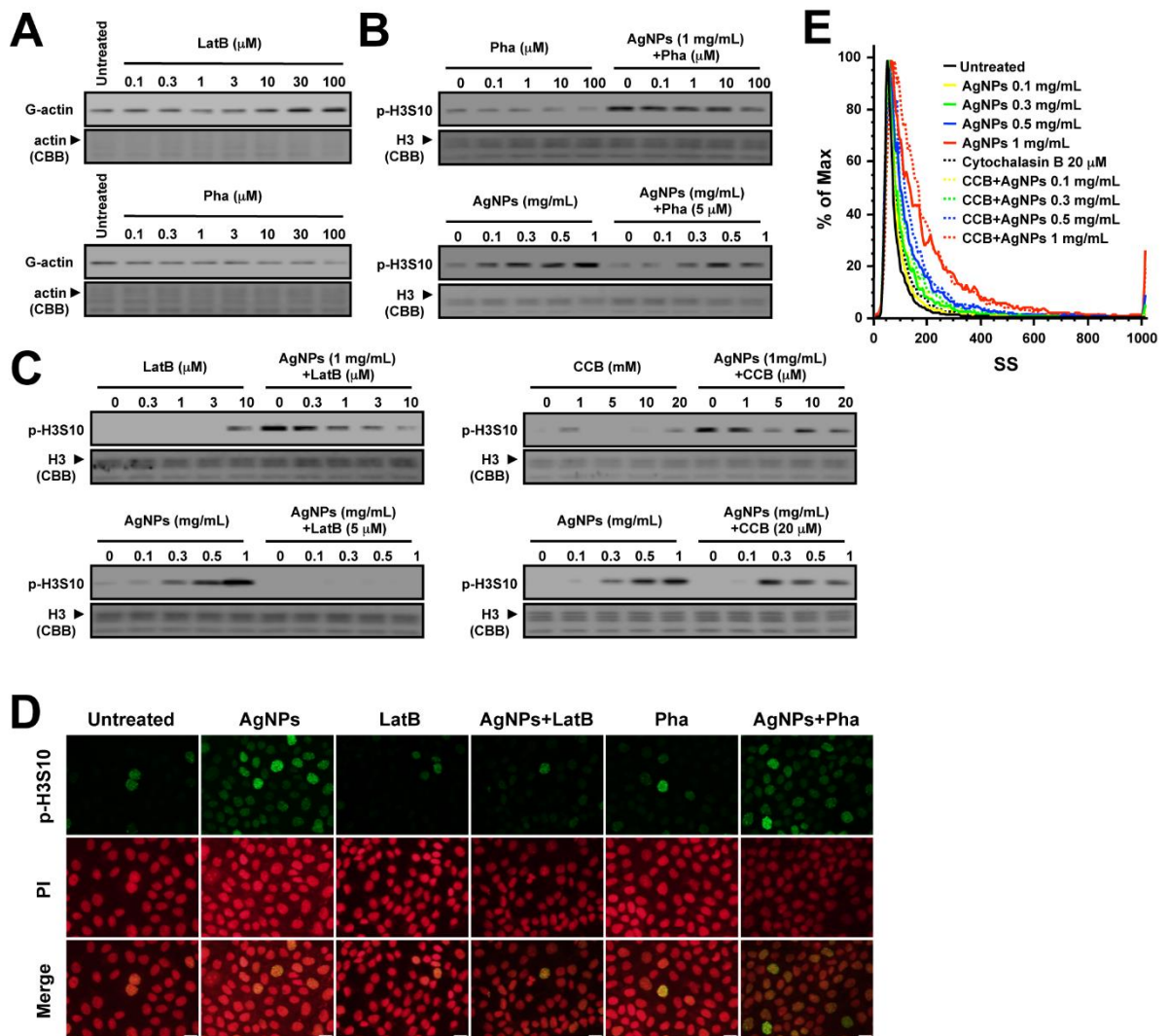


Figure 27. Dynamic state of actin after treatment with AgNPs and p-H3S10

- (A) Dynamic state of Actin after treatment with LatrunculinB (LatB) or Phalloidin (Pha). A549 cells were treated with LatB (0 – 100 μM) or Pha (0 – 100 μM) for 1 h. Actin (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (B) p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of Pha (0 – 100 μM). A549 cells were treated with Pha for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h.
- (C) p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of LatB (0 – 10 μM) or Cytochalasin B (CCB; 0 – 20 μM). A549 cells were treated with LatB or CCB for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h.
- (D) Images of p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of Pha (10 μM), LatB (5 μM) or CCB (20 μM). A549 cells were treated with Pha, LatB or CCB for 0.5 h and treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h. They were stained with the antibody for p-H3S10 and PI. Upper side images: p-H3S10, middle images: PI staining, lower side images: merged images of p-H3S10 and PI.
- (E) Intercellular uptake of AgNPs in the presence of CCB (20 μM). A549 cells were treated with CCB for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h. The cells were analyzed using SS in FCM.

さらに、細胞内に取り込まれた AgNPs からリリースした Ag⁺とアクチンフィラメント動態の関与を検討した (Fig. 28)。AgNPs によるアクチンの脱重合は、NAC の前作用によって阻害された (Fig. 28A)。また、細胞内 G-actin の量は、AgNO₃ の作用濃度依存的に増加した (Fig. 28B)。さらに、AgNO₃ による p-H3S10 の誘導は、LatB および CCB の前作用によって抑制された (Fig. 28C)。以上の結果により、AgNPs による p-H3S10 の誘導では、主に細胞内に取り込まれた AgNPs からリリースした Ag⁺がアクチンを脱重合し、その後のアクチン重合と脱重合を繰り返す過程が p-H3S10 の誘導に関連していると考えられた。

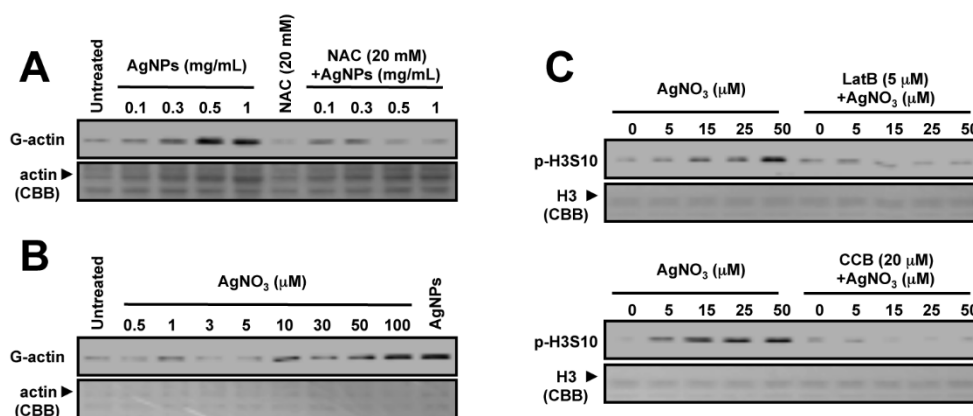


Figure 28. Release of Ag ions from AgNPs and depolymerization of actin

- (A) Release of G-actin after treatment with AgNPs in the presence of NAC (20 mM). A549 cells were treated with NAC for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h. Actin (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.
- (B) Release of G-actin after treatment with AgNO₃. A549 cells were treated with AgNO₃ (0 – 50 μM) for 0.5 h.
- (C) p-H3S10 after treatment with AgNO₃ in the presence of LatB (50 μM) or CCB (20 μM). A549 cells were treated with LatB or CCB for 0.5 h and treated with AgNO₃ (0-50 μM) for 1 h.

4-3-5 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と Aurora kinase の関与

Aurora kinase (AURK) family は、セリン・スレオニンキナーゼのひとつであり、細胞分裂を制御する。ヒトにおいて AURK family には 3 種類 (AURKA、B、C) 存在し、その中、AURKB の活性 (リン酸化: p-AURKB) は、p-H3S10 に強く関連していることが報告されている[83]。そこで、AgNPs による p-H3S10 は AURK、特に AURKB の活性を介して誘導されるものか否か検討した。

AgNPs 作用後 10 時間までの細胞内 AURK のリン酸化のパターンを Fig. 29A に示す。AgNPs 作用直後から、AURKA、B および C のリン酸化が時間依存的に誘導され、6 時間以降の時間帯で未作用細胞のレベルまで回復した。また、AgNPs による AURK のリン酸化の中で、p-AURKB は一番強かった。さらに、AURKB の特異的な阻害剤 ZM を用いて、AURKB が p-H3S10 に関与するか否かを検討した (Fig. 29B)。AgNPs 作用後、濃度および時間依存的に誘導される p-H3S10 は、阻害剤の前作用によって抑制された。また、免疫染色にて、ZM の前作用によって、p-H3S10 の誘導が阻害されることを確認した (Fig. 29C)。一方、阻害剤の前作用によって、AgNPs 細胞内の取り込み量は変化しなかった (Fig. 29D)。以上の結果より、AgNPs が誘導する p-H3S10 は、AURK family 中の AURKB 経路を介していることが明らかになった。

次に、AgNPs によるアクチンフィラメント動態と p-AURKB の関係を決定するため、ZM の存在下におけるアクチンの変化および LatB の存在下における p-AURKB の変化を検討した (Fig. 29E and F)。ZM の前作用によって、AgNPs によるアクチンの脱重合は変化しなかったが、LatB の前作用によって、AgNPs による p-AURKB の誘導が阻害された。この結果より、AURKB 経路は AgNPs によるアクチン重合脱重合変化の下流経路の一つであり、p-H3S10 の誘導に関連していると考えられた。

Cofilin 1 は、F-actin に結合し、F-actin を切断および脱重合する活性を有する蛋白質である。Cofilin 1 をノックダウンすると、F-actin の脱重合を阻害することが報告されている[84]。そこで、Cofilin 1 のノックダウン細胞を作製し、AgNPs による p-H3S10 の誘導とアクチン重合脱重合、およびその後の AURKB の活性化の関連を検討した。今回購入した Life Technologies 社の Stealth RNAi™ siRNA target human Cofilin 1 のノックダウン効率を Fig. 30A に示す。3 つの siRNA 全てにおいて高いノックダウン効率が認められ、以下の実験は oligo ID: HSS141560 の siRNA を用いて行った。

脱重合阻害剤 Pha は、AgNPs による誘導される p-H3S10 を抑えることを前述した (Fig. 27B)。Pha を作用した後と同じ状態であることが予想される Cofilin 1 ノックダウン細胞を用いて検討した結果、Cofilin 1 のノックダウンでは AgNPs の取り込み量は変化しないが、Cofilin 1 のノックダウンにより、AgNPs と AgNO₃ による p-H3S10 の誘導が抑制されることが示された (Fig. 30B and C)。

以上の結果により、AgNPsによるp-H3S10の誘導には、AgNPsが細胞内に取り込まれることが必須であると考えられた。また、細胞内に取り込まれたAgNPsからリリースしたAg⁺がアクチンを重合、脱重合させ、それが原因となりAURKBをリン酸化し、p-H3S10を引き起こすことが考えられた。

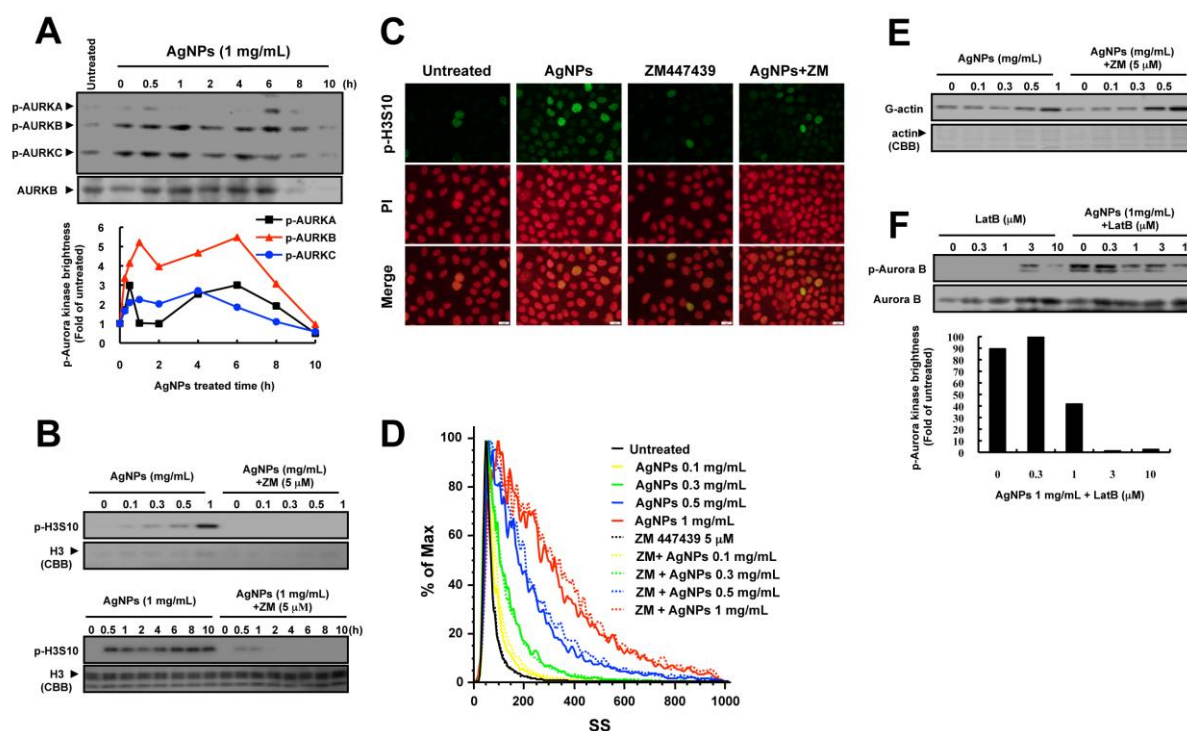


Figure 29. Phosphorylation of Aurora kinase after treatment with AgNPs and p-H3S10

- (A) p-AURKA, B, C and AURKB after treatment with AgNPs. A549 cells were treated with AgNPs (1 mg/mL) for ~10 h.
- (B) p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of ZM 447439 (ZM; 5 μ M). A549 cells were treated with ZM for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 0 – 10 h.
- (C) Images of p-H3S10 after treatment with AgNPs in the presence of ZM (5 μ M). A549 cells were treated with ZM for 0.5 h and treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h. They were stained with the antibody for p-H3S10 and PI. Upper side images: p-H3S10, middle images: PI staining, lower side images: merged images of p-H3S10 and PI.
- (D) Intercellular uptake of AgNPs in the presence of ZM (5 μ M). A549 cells were treated with ZM for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h. The cells were analyzed using SS in FCM.
- (E) Release of G-actin after treatment with AgNPs in the presence of ZM (5 μ M). A549 cells were treated with ZM for 0.5 h and treated with AgNPs (0 – 1 mg/mL) for 1 h.
- (F) p-AURKB after treatment with AgNPs in the presence of LatB (0 – 10 μ M). A549 cells were treated with LatB for 0.5 h and treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h. p-AURK was determined using western blotting, where the intensity of each band was extracted using Image J version 1.38. The extent of p-AURK in cells treated with AgNPs, versus untreated control cells, was calculated. Correlations were calculated using the least-squares method.

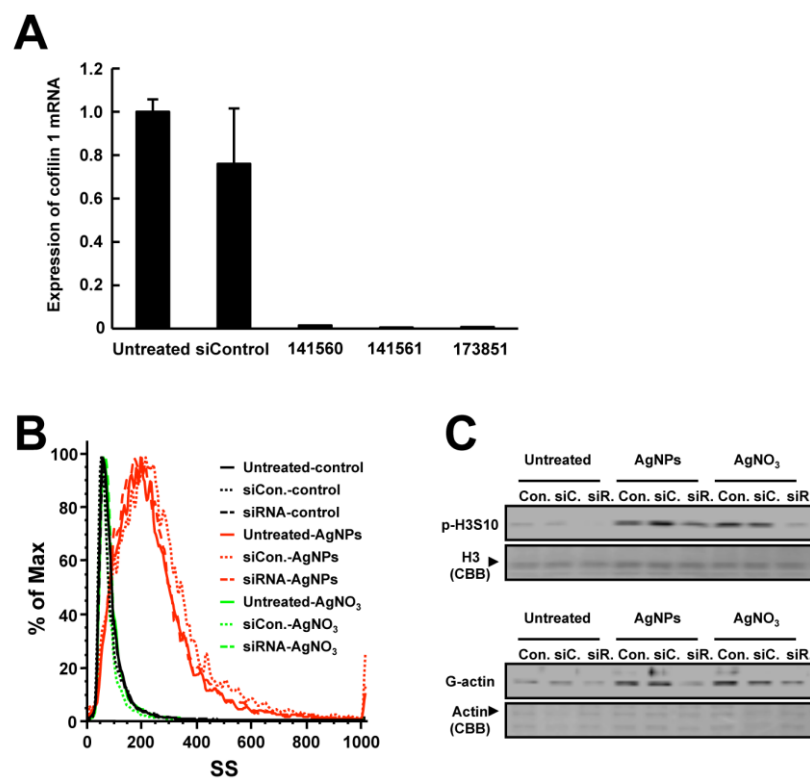


Figure 30. Relationship between actin and the generation of p-H3S10.

- (A) Expression of cofilin 1 mRNA in cells knocked down using siRNA. A549 cells were transfected with siRNA (oligo ID: HSS141560; HSS141561 and HSS173851) or negative control siRNA as described in the experimental procedures. Fold-changes were normalized to GAPDH levels and the ratio to untreated samples was calculated. Stealth siRNA oligo ID: HSS141560 was used in the following experiments.
- (B) Intercellular uptake of AgNPs in cofilin 1-knockdown cells after the treatment with AgNPs or AgNO₃. Cells in which cofilin 1 was knocked down using siRNA were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h, or AgNO₃ (50 μM) for 0.5 h. The cells were analyzed using SS in FCM.
- (C) p-H3S10 or G-actin in cofilin 1-knockdown cells after the treatment with AgNPs or AgNO₃. Cells in which cofilin 1 was knocked down using siRNA were treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1 h, or AgNO₃ (50 μM) for 0.5 h. H3 or Actin (CBB staining) was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE. Con: control, siC: control siRNA, siR: cofilin 1 siRNA.

4-3-6 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化とがん原遺伝子発現制御

c-fos や *c-jun* 等のがん原遺伝子の転写活性における p-H3S10 の関与はよく調べられ、発がんプロモーターが p-H3S10 を介してがん原遺伝子転写を活性化することでがんの促進に関与する可能性が考えられている[85,86]。*c-fos* や *c-jun* はがん原遺伝子の中で最も古くからヒストンの化学修飾と転写活性との関連性が検討されてきた遺伝子であり、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate 等の発がんプロモーターによって強い誘導がかかることから化学物質の発がんプロモーション活性と密接な関連があると考えられている[87,88]。そこで、AgNPs による誘導される p-H3S10 が、がん原遺伝子の *c-fos*、*c-jun* の転写に関与するのか否かを ChIP 法を用いて検討した。

AgNPs 作用後、濃度および時間依存的に *c-jun* 遺伝子が誘導された。一方、*c-fos* の誘導は認められなかった (Fig. 31A)。また、AgNPs による誘導される p-H3S10 のがん原遺伝子の転写活性化への寄与を ChIP 法を用いて検討した (Fig. 31B)。がん原遺伝子の *c-jun* 遺伝子の転写開始点周辺部 2 地点と転写開始点から上流および下流に数千 bp 離れた部位における p-H3S10 の誘導を調べた。その結果、*c-jun* に転写開始点周辺部においてのみ、AgNPs 作用後、顕著な p-H3S10 の増加が確認された。リン酸化の亢進は転写開始点周辺部に限られていることから、p-H3S10 が転写因子のリクルートメントに関与する可能性が示唆された。

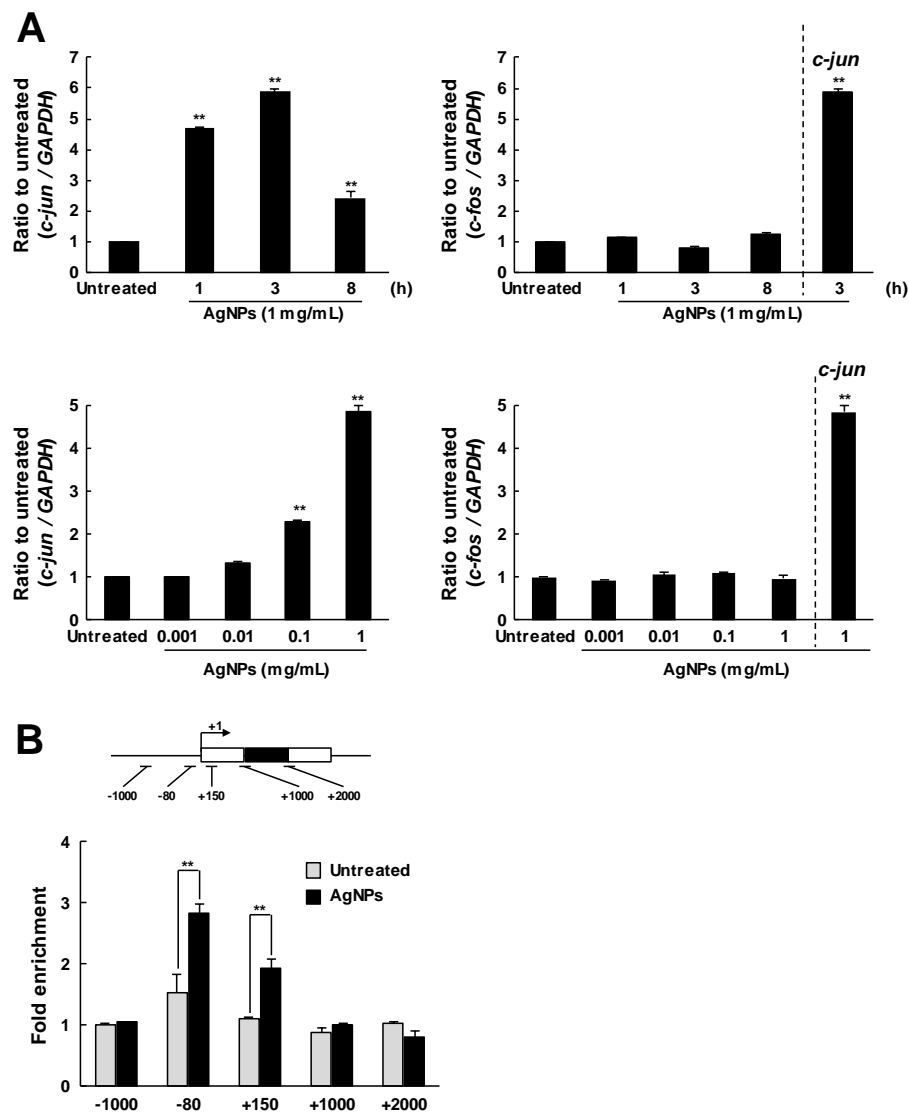


Figure 31. p-H3S10 at promoter regions for *c-jun* after treatment with AgNPs.

- (A) Induction of *c-jun* or *c-fos* mRNA after the treatment with AgNPs. A549 cells were treated with several doses (0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/mL) of AgNPs for ~8 h. Data were normalized to *GAPDH* levels and the ratio of *c-jun* or *c-fos* induction in treated samples versus untreated samples was calculated. ** $p < 0.01$.
- (B) p-H3S10 at promoter regions for *c-jun*. Schematic diagram representing the relative positions of the *c-jun* regions amplified by the primers used in the PCR step of ChIP assays. Untranslated regions are indicated by open boxes and coding regions are shown by filled boxes. Cross-linked chromatin fragments were prepared from A549 cells treated with AgNPs (1 mg/mL) for 1.5 h. The data are given as enrichment values against input and represented as a ratio to the untreated (-1000). Gray column: untreated, black column: treated with AgNPs. ** $p < 0.01$.

4-4 考察

本章では、AgNPs は、ヒト培養細胞において、p-H3S10 を持続的に誘導することを初めて明らかにした。その誘導メカニズムとして、AgNPs が細胞内に取り込まれ、そして、細胞内に取り込まれた AgNPs からリリースした Ag⁺がアクチンを重合、脱重合させ、それが原因となり AURKB をリン酸化し、p-H3S10 を引き起こすと考えられた。

AgNPs による誘導された p-H3S10 の強度は細胞株依存的に変化することを明らかにした (Fig. 22A)。また、リン酸化の誘導強度は、銀粒子のサイズが小さい方が強かった (Fig. 23D)。これは、前述した γ -H2AX の誘導と同様に、AgNPs の細胞内の取り込み量に強く関連していることが考えられた。さらに、第 1 章に示したように AgNPs の殺菌効果においても、小さいサイズの AgNPs が *E. coli* 内に取り込まれることが必須であった。これらのことを合わせると、AgNPs の取り込みは、AgNPs により引き起こされる様々な生体反応において重要な因子と考えられる。

p-H3S10 は細胞分裂期におけるクロマチンの凝集に関与するとともに[89,90]、各種刺激によって遺伝子の転写が活性化される際にも誘導されることが知られている[85,86]。前者の場合、有糸分裂に伴う染色体構造の部分でリン酸化が見られるが、Fig. 22B の免疫染色法による p-H3S10 の観察の結果、細胞核全体にリン酸化される特徴を示した。また、p-H3S10 が誘導された時間帯が 30 分と非常に早いことから、AgNPs による p-H3S10 の誘導は有糸分裂に伴うものではなく、がん原遺伝子等の特定の遺伝子の転写活性化に関与していると考えられた。近年、ニッケルおよびヒ素等の様々の金属による p-H3S10 を誘導し、その後、遺伝子発現と発がんにつながることを報告されている[91,92]。ヒ素による誘導された p-H3S10 はがん原遺伝子 (*c-jun* および *c-fos*) の転写活性を高めることから、発がんにつながる可能性がある[91]。また、ニッケルイオンは、Mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK) を介して p-H3S10 を誘導することも明らかにされている[92]。本研究において、AgNPs による *c-fos* および *c-jun* の転写活性を検討した結果、AgNPs により誘導された p-H3S10 は *c-jun* 遺伝子に強く関連していることが明らかとなった。上述した報告は本研究と一致し、AgNPs 曝露後、発がんに結びつく可能性が考えられる。

また、AgNPs による p-H3S10 の誘導は、AURK family 中の AURKB の活性化に強く関連することを明らかにした。遺伝子の転写活性化に関連する p-H3S10 は、Snf1、MSK、IKK- α 等のキナーゼにより誘導されることが報告されている[93-95]。例えば、MSK1/MSK2 をノックアウトした細胞では、増殖刺激によるリン酸化は見られないが、分裂期特異的なリン酸化は起きることが報告されている[93]。一方、AURK family は、細胞内分裂期特異的に H3 をリン酸化するキナーゼの候補として、最初、出芽酵母と線虫を用いた解析から挙げられた[96]。その中で、AURKB は、Inner centromere protein

(INCENP)と Survivin と複合体を形成し、共同で紡錘体集合チェックポイントの維持を行っていることがよく知られている[97]。本研究では、AURKB は、前述した分裂期特異的に H3 リン酸化を誘導すること以外、がん原遺伝子に関連する p-H3S10 も誘導することが観察された。しかし、AURKB によりリン酸化された他のキナーゼを介して p-H3S10 が起きている可能性もあり、これについてさらに詳細な解析が必要と考えられる。

さらに、AgNPs による AURKB の活性化は、アクチン重合阻害剤 LatB の前作用により抑制された (Fig. 29F)。AgNPs はエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれることがよく知られている[81]。アクチンは、細胞の形状変化、ならびに細胞運動性、接着性、細胞質分裂、エンドサイトーシス等の多数の細胞プロセスで重要な役割を果たしている[82]。Rho family をはじめとした低分子量 G 蛋白質やその下流分子 (WASP/WAVE family 蛋白質や Arp 2/3 複合体) の活性化により、アクチンは重合と脱重合を繰り返す過程を制御することが報告されている[98]。また、分裂期において Rho family と AURK family は、Cdk1-cyclin B 依存的にリン酸化 (活性化) を受けることが明らかにされている[83,99]。このことから、AgNPs 作用後、Cdk1-cyclin B を活性化し、アクチンの脱重合を亢進させ、さらに、同時に AURKB をリン酸化し、p-H3S10 を引き起こす可能性が考えられる。

AgNPs による誘導された持続的な p-H3S10 に対して、ヒストン H3 のアセチル化 (Ac-H3K9, Ac-H3K14 および Total-Ac-H3) は、AgNPs 曝露後、2 時間以降の時間帯では速やかに減少することが認められた (Fig. 22A)。最近まで、ヒストン修飾はそれぞれ独立して機能すると考えられ、互いにその働きには関連性はないと思われていた。しかし、現在では、ヒストン修飾は一体となって働き、異なる修飾でも相互に関連することが明らかとなっている[100,101]。例えば、H3 セリン 10 番目がリン酸化されるとヒストンアセチル化酵素による 14 番目のリジンのアセチル化が促進されることが報告されている[101]。これは本研究で得られた結果とは一致しなかった。ヒストンがアセチル化を受けると、クロマチン構造を緩め、露出した DNA を増加することが考えられる。本研究で示された AgNPs によるヒストン修飾の攪乱は、クロマチン構造を変化させ、UV による DNA 損傷生成に影響した可能性が考えられる。これについては、今後の検討課題である。

また、以前の研究において、アクチンが DNA 損傷に応答する p53 に関与していることが報告されている[102,103]。アクチンフィラメントは密接に p53 の初期増加の段階に関連し、その後、p53 と F-actin を結合し、DNA 損傷に応答する。本研究では、AgNPs 作用後のアクチンを検討した結果、AgNPs 作用によりアクチンが明らかに脱重合することを明らかにした (Fig. 26)。このことから、AgNPs 曝露後、アクチンの変

化が DNA 損傷応答経路に影響する可能性も十分考えられ、これについて、今後より詳細な検討が求められる。

AgNPs による p-H3S10 の誘導メカニズムに加えて、興味深いことは、AgNPs 単独作用は p-H3S10 を著しく誘導したにもかかわらず、細胞の生存率にはほとんど影響がないことである (Fig. 8)。AgNPs 作用によって生じた DNA 損傷が完全に修復されれば問題は無いが、AgNPs 作用による γ -H2AX が継続的に検出されることは前述した通りであり (Fig. 9)、また、AgNPs 作用による p-H3S10 はがん原遺伝子の発現に関連することが本章で明らかになった。これらの知見は AgNPs 作用による発がんとの関連性を示唆するものであり、今後の AgNPs の生体影響研究において重要な知見であると考えられる。

第 4 章の内容を Fig. 31 にまとめた。第 4 章においては、主に AgNPs により p-H3S10 が持続的に誘導されることを実証した。AgNPs による p-H3S10 の誘導には、AgNPs が細胞内に取り込まれることが必須であると考えられた。また、細胞内に取り込まれた AgNPs からリリースした Ag^+ がアクチンを重合、脱重合させ、それが原因となり AURKB をリン酸化し、p-H3S10 を引き起こすことが考えられた。さらに、がん原遺伝子である *c-jun* のプロモーター領域の近辺のヒストンは、AgNPs によりリン酸化しやすことが示された。

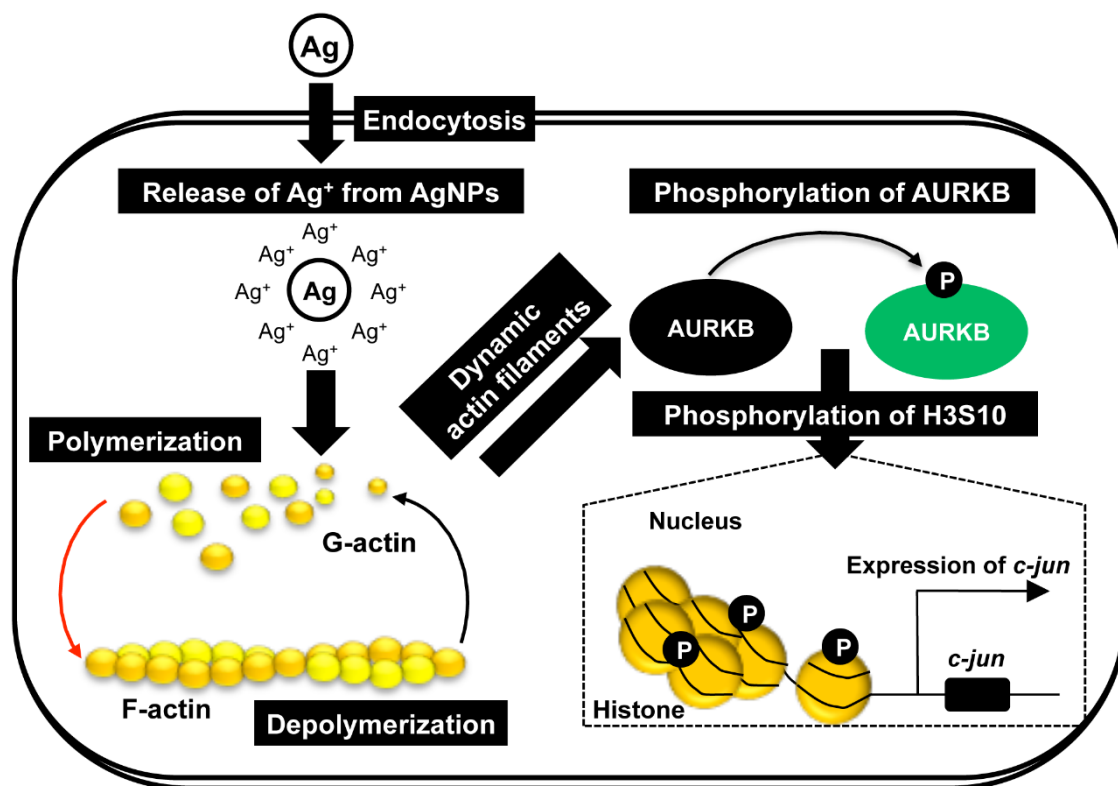


Figure 32. AgNPs-induced phosphorylation of histone H3 at Ser 10

第 5 章 ヒストン H3 リン酸化とフローサイトメーターの側方散乱光を指標した銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発

5-1 序論

近年、多種多様なナノサイズの粒子が各種産業に使用されるようになった。粒子をナノサイズ化することにより、従来の粒子にはない新しい物理化学的特性等が備わるため各種産業で精力的な開発が進められている。その一方で、その小ささゆえに発揮されるナノサイズ特異的な毒性「ナノ毒性」が危惧されている。ナノ粒子は生体内に取り込まれやすく、血流に入った場合、様々な器官に分散、蓄積され、毒性を示す可能性がある事が指摘されている[104,105]。また細胞内に取り込まれたナノ粒子は DNA やミトコンドリア、細胞膜といった細胞器官に損傷を与えることが懸念されている。今後、様々な形態でナノ粒子が我々の生活環境にますます浸透していくと考えられる。このような状況下で、我々はこれらナノ粒子の安全性や毒性について十分な知識を持つ必要があり、それを知るためのナノ毒性評価方法の確立が望まれる。しかし現状ではナノ毒性を評価するための有用な指標は定まっておらず、その評価方法は暗中模索の状態である。

本研究室ではこれまでに、フローサイトメーターの側方散乱光 SS 強度を利用して、細胞内への粒子の取込みを簡単かつ迅速に検出できる方法を見出している[31]。また、この方法は、第 1 および 2 章で使用した様に微生物 (*E. coli*)、ヒト培養細胞 (HaCaT、A549、MCF-7) 等、様々な評価対象に適応可能である。これを利用すれば、どの様な形状の、どの様なサイズの粒子が取り込まれやすいかを簡易スクリーニングできる。

しかし、フローサイトメーターの SS 強度では粒子の取り込みしか評価できない。取り込まれた粒子全てが生体に影響するとは限らず、たくさん取り込まれても何の影響も引き起こさなければ毒性は示さないであろう。つまり、AgNPs の生体影響を評価するためのもう一つの因子を SS 強度と同時に検討すれば、取り込まれた粒子の生体影響をより確実にすることができる。そこで、本章では、その評価対象の一つとして、第 4 章で述べた p-H3S10 に注目し、SS と同時測定し、AgNPs の生体影響の評価に利用することが有用であるか否かを検討した。

5-2 実験材料および方法

5-2-1 実験材料

第 2 章 2-2-1 に示したヒト皮膚細胞 HaCaT、およびヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 を用いた。また、第 1 章 1-2-1 に示した銀粒子 (<0.1 μm 、2 – 3.5 μm 、5 – 8 μm 、<45 μm および <106 μm) を使用した。

5-2-2 細胞の培養

第 2 章 2-2-3 に示したように HaCaT、および A549 細胞を培養した。

5-2-3 銀粒子作用

第 4 章 4-2-3 と同様に銀粒子を作用した。

5-2-4 ウェスタンブロット法による p-H3S10 の検出

第 4 章 4-2-4 と同様に、Western blotting によって p-H3S10 の検出を行った。

5-2-5 細胞内への銀粒子の取り込み量の測定

第 4 章 4-2-6 と同様に、細胞内の銀粒子の取り込み量は FCM を用いて測定した。

5-2-6 銀粒子の取り込み量とヒストン H3 リン酸化強度の解析法

FCM の SS 強度を指標とした粒子の細胞内への取り込みと p-H3S10、両方を測定することにより、AgNPs の効果的な影響の指標となる可能性を検討するため、細胞内へ AgNPs の取り込み (SS の平均値) と p-H3S10 の強度との相関を解析した。Western blotting によって検出した p-H3S10 のバンドの強度は ImageJ (version 1.38) を用いて定量した。また、AgNPs を作用した細胞における p-H3S10 の程度は、未作用の対照細胞に対して算出された。相関係数は、最小二乗法を用いて計算した。

5-3 実験結果

5-3-1 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と細胞内取り込み量の相関

AgNPs の取り込みと p-H3S10 との関係を明確にするために、Fig. 23 および 24 に示した A549 および HaCaT 細胞の p-H3S10 のバンドを定量化し、FCM の SS と p-H3S10 の強度の平均値をプロットした (Fig. 33 and 34)。AgNPs の作用濃度の増加に伴い、AgNPs の取り込み量 (FCM の SS 強度平均値) および AgNPs による p-H3S10 の強度は直線的に増加した (Fig. 33A and 34A)。また、AgNPs の取り込み量と AgNPs による p-H3S10 の強度は比例した。それぞれの相関係数は、 $R^2=0.9602$ 、 $R^2=0.9001$ および $R^2=0.9260$ である。

次に、異なるサイズ銀粒子による細胞内の取り込み量と p-H3S10 の相関を解析した (Fig. 33B and 34B)。その結果、取り込み量が多かった AgNPs および 2–3.5 μm の粒子だけ p-H3S10 を検出したため、AgNPs の取り込み量と p-H3S10 の相関は認められなかった。また、NaN₃ および 2-DG の存在下において、AgNPs の作用濃度、取り込み量 およびリン酸化の相関性を解析した結果を Fig. 33C and 34C に示した。AgNPs の作用濃度と取り込み量、作用濃度と p-H3S10、さらに、取り込み量と p-H3S10 の相関を示す直線は、阻害剤の存在下では直線の傾斜が平坦になって、x 軸と平行になった。

5-3-2 銀ナノ粒子によるヒストン H3 リン酸化と銀イオンの相関

AgNPs の取り込み量と p-H3S10 の強い相関より、p-H3S10 は、AgNPs の取り込みを反映していると考えられるが、実は、粒子の取り込み量が同じでも、AgNPs の表面からリリースした Ag⁺の量は、粒子の形状や凝集状態等によって違う場合も考えられる。そこで、Fig. 33D and 34D は NAC の存在下および非存在下における、AgNPs の取り込み量と p-H3S10 の強度の平均値をプロットした。AgNPs の作用濃度と SS 強度の相関には、NAC の前作用は影響しなかった。しかし、NAC の前作用は、AgNPs の作用濃度に伴い誘導される p-H3S10、および AgNPs の取り込み量の増加に伴うと p-H3S10 の傾きを減少させた。これは、p-H3S10 を誘導するため、Ag⁺が必要であることを示していた。

以上の結果により、AgNPs による p-H3S10 には、AgNPs が細胞内に取り込まれること、そして、細胞内に取り込まれた粒子から Ag⁺が放出すること、両方が関与していることを再確認した。従って、FCM の SS 強度を指標とした粒子の細胞内への取り込みと p-H3S10 の両方を測定することにより、AgNPs の効果的な影響の指標となる可能性が考えられた。

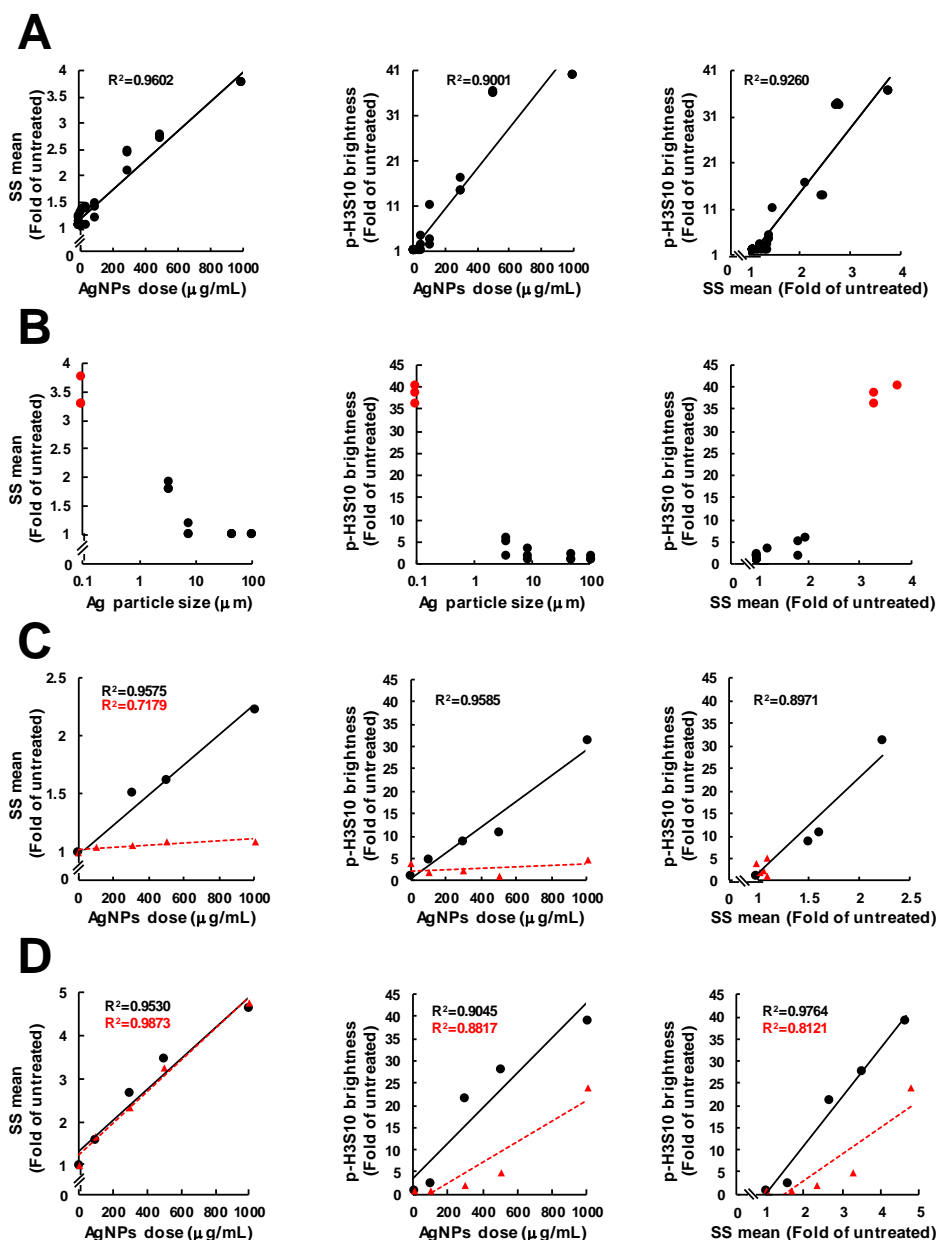


Figure 33. Correlation between intercellular uptake of AgNPs and p-H3S10 in A549 cells.

- (A) A549 cells were treated with several doses (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) of AgNPs for 1 h. Correlation between intercellular uptake of AgNPs (average values of SS) and p-H3S10. p-H3S10 was determined using western blotting, where the intensity of each band was extracted using Image J version 1.38. The extent of p-H3S10 in cells treated with AgNPs, versus untreated control cells, was calculated. Correlations were calculated using the least-squares method.
- (B) A549 cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) of different sizes (< 0.1 μm , 2 – 3.5 μm , 5 – 8 μm , < 45 μm and < 106 μm) for 1 h. Red circles: AgNPs (listed size: < 0.1 μm), Black circles: Ag particles (listed size: 2 – 3.5 μm , 5 – 8 μm , < 45 μm and < 106 μm).
- (C) A549 cells were treated with AgNPs in the presence of 10 mM NaN_3 and 50 mM 2-DG to inhibit endocytosis. Circles: inhibitors (-); triangles: inhibitors (+). Solid line: inhibitors (-); dotted line: inhibitors (+).
- (D) A549 cells were treated with AgNPs in the presence of 20 mM NAC to remover of Ag ions. Circles: NAC (-); triangles: NAC (+). Solid line: NAC (-); dotted line: NAC (+).

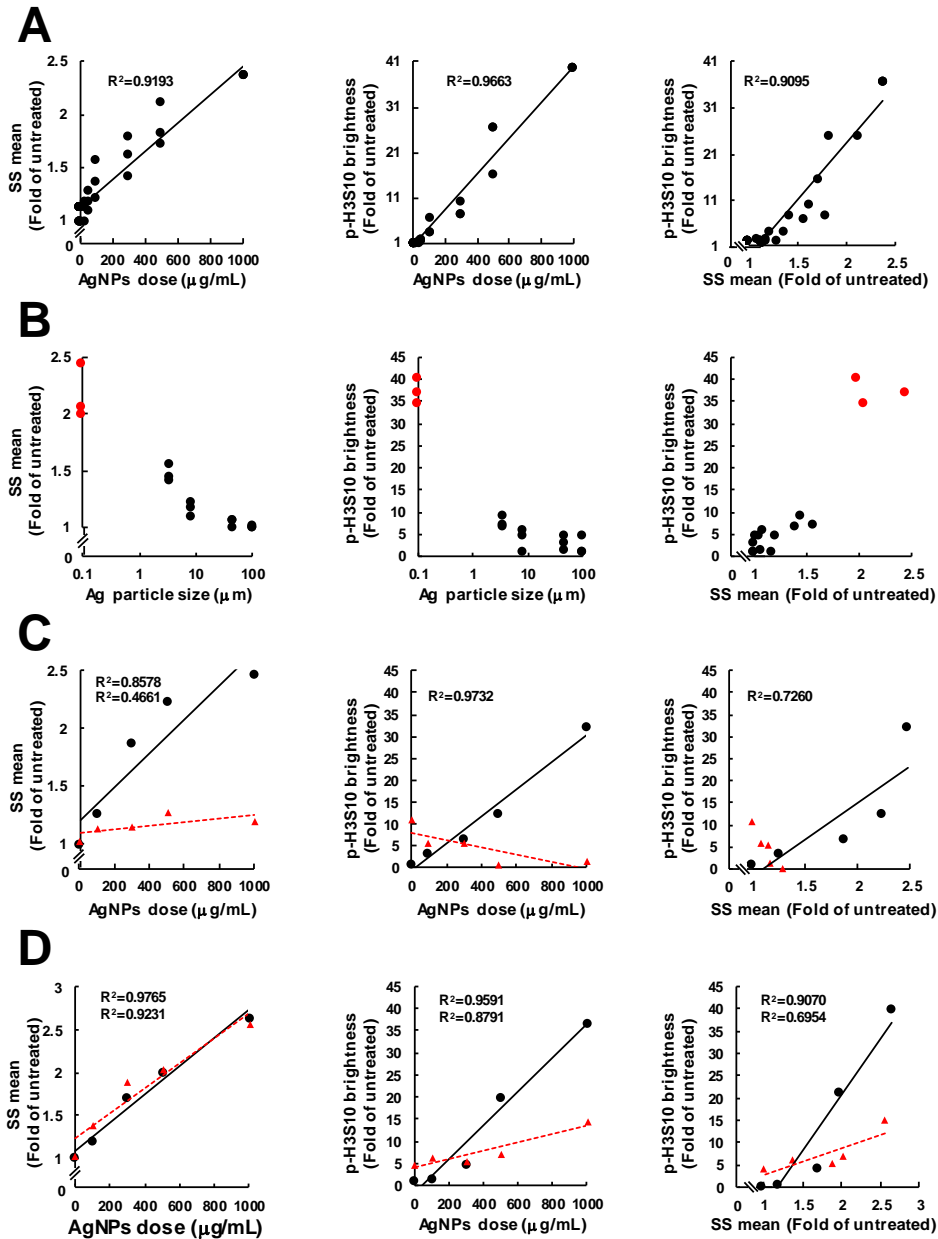


Figure 34. Correlation between intercellular uptake of AgNPs and p-H3S10 in HaCaT cells.

- (A) HaCaT cells were treated with several doses (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) of AgNPs for 1 h. Correlation between intercellular uptake of AgNPs (average values of SS) and p-H3S10. p-H3S10 was determined using western blotting, where the intensity of each band was extracted using Image J version 1.38. The extent of p-H3S10 in cells treated with AgNPs, versus untreated control cells, was calculated. Correlations were calculated using the least-squares method.
- (B) HaCaT cells were treated with Ag particles (1 mg/mL) of different sizes (< 0.1 μm , 2 – 3.5 μm , 5 – 8 μm , < 45 μm and < 106 μm) for 1 h. Red circles: AgNPs (listed size: < 0.1 μm); Black circles: Ag particles (listed size: 2 – 3.5 μm , 5 – 8 μm , < 45 μm and < 106 μm).
- (C) HaCaT cells were treated with AgNPs in the presence of 10 mM NaN_3 and 50 mM 2-DG to inhibit endocytosis. Circles: inhibitors (-); triangles: inhibitors (+). Solid line: inhibitors (-); dotted line: inhibitors (+).
- (D) HaCaT cells were treated with AgNPs in the presence of 20 mM NAC to remover of Ag ions. Circles: NAC (-); triangles: NAC (+). Solid line: NAC (-); dotted line: NAC (+).

5-4 考察

近年のナノ産業の発達に伴って、小ささゆえに発揮されるナノサイズ特異的な毒性、いわゆる「ナノ毒性」が危惧されている。一方、ナノ毒性を評価するための有用な指標は定まっていない。本研究では、AgNPs が p-H3S10 を誘導することを明らかにした。それは、細胞内に取り込まれた AgNPs からの Ag⁺の放出に強く依存している。FCM の SS 強度を指標として、ナノ粒子の取り込みを評価できることは、本研究室鈴木らの報告以来、他の多くの研究者により使用されている[106-108]。これを利用すれば、どの様な形状の、どの様なサイズの粒子が取り込まれやすいかをスクリーニングできる。

しかし、この方法はナノ粒子の取り込みを評価するだけに限定され、他の毒性学的反応を反映しない。また、SS 強度は粒子から放出したイオンの毒性も評価できない。前述した p-H3S10 には、細胞内への AgNPs の取り込み、そして、その後の Ag⁺の放出、両方を必要とするため、同時に SS 強度と p-H3S10 を検出することは、単独の SS 強度を検出することに比べ、より意味がある分析結果が得られると考えられる。

FCM の SS 強度分析のもう一つの利点は、生きている細胞を解析できることである。本研究では、AgNPs の取り込み量および p-H3S10 を別々の方法を用いて検討、解析したが、将来、p-H3S10 との高い親和性を有する蛍光標識タンパク質の開発を行い、FCM を用いて、生きている細胞内での同時に SS 強度と p-H3S10 の測定を可能にすることを目標にしている。

p-H3S10 は 0.1 mg/mL という比較的な低濃度の AgNPs 作用によって誘導されることが確認された (Fig. 33A and 34A)。一方で、AgNPs の細胞生存率に与える影響は 1 mg/mL でも僅かな変化しか認められなかった (Fig. 8B)。この結果は、p-H3S10 を指標に、AgNPs の影響を高感度に検出することが出来るということを示していた。また、AgNPs 作用による p-H3S10 はがん原遺伝子の発現に関連することが認められ、発がんに結びつく可能性は第 4 章考察に記した通りである。さらに、この結果の視点を変えると、p-H3S10 を指標に生存率変化では捉えることができない AgNPs の影響を検出が可能であるということになり、p-H3S10 が AgNPs の生体影響を評価するための有用な指標の一候補になることが期待される。

総括

銀の広域な抗菌特性は、水や空気の浄化、化粧品、衣類、家庭用製品など、多方面で利用されている。近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、サイズが 100 nm 以下の AgNPs が開発されている。従来の銀粒子に比べサイズが小さく、総表面積が増加するため、より顕著的な殺菌効果を示すことが期待される。一方、UV による殺菌は、全ての菌種に対して有効であり、特に水処理の分野で進められている。また、最近では、UV の殺菌効率を向上させるため、様々な金属ナノ粒子と UV の併用が殺菌に応用されている。しかし、AgNPs と UV の組み合わせによる殺菌効果の研究はほとんど行われていない。

第 1 章では、AgNPs と UV の組み合わせによる *E. coli* に対する殺菌効果とその殺菌メカニズムを中心に検討した。UVA (320–400 nm) 照射下における AgNPs 作用は、それぞれの単独作用に比して、劇的な殺菌効果を示した。また、顕著な殺菌効果を示すためには、*E. coli* 内への AgNPs の取り込みと、*E. coli* 内での持続的な Ag⁺の放出の両方が必須であった。さらに、AgNPs と UVA の複合曝露が、菌体内 GSH 量を有意に減少させたことより、UVA 照射下での AgNPs 作用では、*E. coli* 内に取り込まれた AgNPs が、その菌体内で UVA 照射されることにより多量の Ag⁺を放出、SH 基を有する分子と結合することで効果的な殺菌効果を示すことが明らかになった。

我々は、日常的に UV に曝露されている。UVA 存在下、高い殺菌効果を AgNPs が示すのであれば、我々ヒトにも何らかの影響を示すことが危惧される。第 2 章では、ヒト培養細胞を用いて、UVA 照射下での AgNPs 作用後の DNA 損傷生成を、DNA 損傷を高感度に検出できるバイオマーカーである γ -H2AX を指標に検討した。これまでに、AgNPs、UVA はそれぞれヒト細胞において DNA 損傷を引き起こすことが報告されており、生じた DNA 損傷は突然変異発生の原因となり、発がん等に結びつくと考えられている。本研究では 3 種類のヒト培養細胞に AgNPs を作用した後、UVA を照射した。AgNPs の作用濃度依存的に γ -H2AX が観察され、UVA 照射下では、より顕著な γ -H2AX の誘導が示された。また、 γ -H2AX の誘導はマイクロサイズの銀粒子では認められず、ナノサイズの AgNPs に特異的であった。*E. coli* の時と同様に、細胞内 GSH 量は、UVA 照射下での AgNPs 作用により減少したことから、細胞内の酸化が上昇したことが考えられた。そこで、酸化型 DNA 損傷である 8-OHdG を検討した結果、AgNPs と UVA 複合曝露は、8-OHdG の生成を亢進させた。8-OHdG の修復過程や DNA 複製時に、DSBs が生じ γ -H2AX が誘導されることが報告されている。BSFGE を用いた解析により、AgNPs 作用による DSBs の生成が、UVA 照射により亢進することが示された。さらに、DSBs とそれに伴う γ -H2AX の生成は Ag⁺除去剤の存在下で軽減され

たことより、UVA 照射により AgNPs 表面から多量に放出された Ag⁺が細胞内抗酸化分子の SH 基と反応し、細胞内酸化を亢進させ、8-OHdG の生成が増加、DSBs ならびにγ-H2AX の亢進につながったと考えられた。

Ag⁺は、SH 基を有する分子に結合するだけでなく、DNA にも作用することが報告されている。Ag⁺が結合した DNA では、短波長 UV 吸収領域が変化する可能性がある。第 3 章では、Ag⁺存在下での UVB (310 nm) 照射後の DNA 損傷生成を検討した。その結果、Ag⁺の存在により、UVB 照射によって形成される CPDs および 6-4PPs が増加し、誘導される DSBs も増加した。以上、第 2 および 3 章において、UV、AgNPs それぞれ単独作用により誘導される数種類の DNA 損傷が、両者の複合曝露により増加することを明らかにした。本研究では、*in vitro* 系 (細胞系) で実験を行ったが、*in vivo* 系 (実験動物) において、今後、より慎重に評価することが重要と考えられる。

AgNPs と UV の複合曝露時に DNA 損傷が亢進する理由の一つとして、AgNPs により DNA クロマチン構造が変化し、UV に対する感受性が変化したことが考えられる。例えば、クロマチン構造中の主要蛋白質であるヒストンがアセチル化されると、クロマチン構造が緩んで、DNA 損傷の修復率を変化させる。そこで、第 4 章では、AgNPs によるヒストンの修飾変化について検討した。AgNPs によるヒストン H3 のリン酸化、アセチル化、メチル化を解析した結果、がん原遺伝子の転写制御に関わっている p-H3S10 が強くまた、持続的に起こることを見出した。p-H3S10 の誘導は、マイクロサイズの銀粒子では起こらず、AgNPs 特異的であった。Ag⁺除去剤を用いた解析により、p-H3S10 が長時間にわたり誘導されるのは、サイズの小さい AgNPs が細胞内に取り込まれ、そこから Ag⁺が持続的に放出されるためと考えられた。また、p-H3S10 の誘導メカニズムを解析ところ、細胞内に取り込まれた AgNPs からリリースした Ag⁺がアクチンを重合、脱重合させ、それが原因となりセリン・スレオニンキナーゼの一つである AURKB をリン酸化し、p-H3S10 を引き起こすことが考えられた。さらに、AgNPs による p-H3S10 の亢進が、がん原遺伝子である *c-jun* の転写活性化をすることを明らかにし、発がんに関与している可能性を示した。以上、第 4 章において、AgNPs によって p-H3S10 が誘導されることが明らかとなり、AgNPs が DNA を取り巻く蛋白質にも影響し、DNA 損傷生成、修復を変化させる可能性が示唆された。

以上の結果からナノサイズの AgNPs がヒトに影響を与えることが懸念されるが、様々な種類の AgNPs が開発される中、AgNPs のヒトへの影響を評価可能な検出法は存在しない。そこで、第 5 章では、AgNPs によるヒストン修飾変化を利用して、AgNPs の影響を評価する簡易スクリーニング系の構築を試みた。AgNPs が DNA 損傷を誘導したり、ヒストンを修飾するには、細胞内に効果的に取り込まれることが必須であることが本研究で明らかになったので、粒子の取り込みを検出可能な FCM の側方散乱

光 SS 強度を第一の指標とした。そして、第 4 章で明らかにした p-H3S10 の誘導を第二の指標にして、FCM で同時測定する系を考案し、両者の相関を検討した。細胞内に取り込まれ易い AgNPs は高い SS 強度を示し、それに対応して p-H3S10 が上昇した。一方、マイクロサイズの銀粒子では SS 強度、p-H3S10 とも上昇しなかった。本スクリーニング系は、粒子の取り込まれ易さと細胞応答を同時解析するシステムであり、今後細胞応答の指標を増やすことで、より効果的な簡易スクリーニング系が構築されることが期待された。

以上本研究において、UV 照射下での AgNPs 作用は、効果の高い殺菌法の一つであることを明らかにした。一方、その作用は、ヒト細胞においては DNA 損傷の生成を亢進することを示し、AgNPs が UV 照射下ではヒトに影響を与える危険性を提示した。銀はこれまで安全性が高いと考えられ、様々な分野で使用されてきたが、粒子サイズが小さくなること、また UV をはじめとする別の環境要因と複合曝露されることにより、異なった影響を及ぼす可能性がある。今後、AgNPs の開発においては、それらを考慮し、利点とリスク、両方を考えて検討していく必要があると考える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、ご鞭撻を頂きました本大学 大学院薬食生命生命科学学府 環境科学専攻 光環境生命科学研究室 伊吹裕子教授ならびに、豊岡達士助教に厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査および推敲をして頂きました本学府同専攻 生体機能学研究室 下位香代子教授、本学府 若林敬二特任教授、ならびに本学府 食品栄養科学専攻 食品衛生学研究室 増田修一准教授に深謝申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、8-OHdG の測定にご協力頂きました本大学 看護学部 看護学科 高林ふみよ准教授に厚く御礼申し上げます。

研究生生活全般にわたり、ご支援およびご指導頂きました皆様に深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Hijnen, WA., Beerendonk, EF. and Medema, GJ.: Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.*, **40**, 3-22 (2006).
- 2) Walker, DC., Len, SV. and Sheehan, B.: Development and Evaluation of a Reflective Solar Disinfection Pouch for Treatment of Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2545-2550 (2004).
- 3) Frederick, JE.: Ultraviolet Sunlight Reaching the Earth's Surface: A Review of Recent Research. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 175-178 (1993).
- 4) Nowack, B., Krug, HF. and Height, M.: 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 1177-1183 (2011).
- 5) Chen, X. and Schluesener, HJ.: Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.*, **176**, 1-12 (2008).
- 6) Marambio-Jones, C. and Hoek, EMV.: A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.*, **12**, 1531-1551 (2010).
- 7) Fujishima, A., Rao, TN. and Tryk, DA.: Titanium dioxide photocatalysis. *J. photochem. photobiol. C*, **1**, 1-21 (2000).
- 8) Cho, M., Snow, SD., Hughes, JB. and Kim, JH.: Escherichia coli Inactivation by UVC-Irradiated C60: kinetics and mechanisms. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 9627-9633 (2011).
- 9) Hou, WC. and Jafvert, CT.: Photochemistry of aqueous C60 clusters: evidence of 1O₂ formation and its role in mediating C60 phototransformation. *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 5257-5262 (2009).
- 10) Kim, SW. and An, YJ.: Effect of ZnO and TiO₂ nanoparticles preilluminated with UVA and UVB light on Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 243-253 (2012).
- 11) Han, J., Qiu, W. and Gao, W.: Potential dissolution and photo-dissolution of ZnO thin films. *J. Hazard. Mater.*, **178**, 115-122 (2010).

- 12) Butkus, MA., Labare, MP., Starke, JA., Moon, K. and Talbot, M.: Use of aqueous silver to enhance inactivation of coliphage MS-2 by UV disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2848-2853 (2004).
- 13) Butkus, MA., Talbot, M. and Labare, MP.: Feasibility of the silver-UV process for drinking water disinfection. *Water Res.*, **39**, 4925-4932 (2005).
- 14) Kim, JY., Lee, C., Cho, M. and Yoon, J.: Enhanced inactivation of E. coli and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. *Water Res.*, **42**, 356-362 (2008).
- 15) Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, HC., Wang, T., Liao, CY., Cui, L., Zhou, QF., Yan, B. and Jiang, GB.: Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size *Nanotoxicology*, **4**, 319-330 (2010).
- 16) Singh, RP. and Ramarao, P.: Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, **213**, 249-259 (2012).
- 17) Eom, HJ. and Choi, J.: p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 8337-8342 (2010).
- 18) Foldbjerg, R., Irving, ES., Hayasi, Y., Suherland, DS., Thorsen, K., Autrup, H. and Beer, C.: Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver. *Toxicol. Sci.*, **130**, 145-157 (2012).
- 19) Jiang, X., Foldbjerg, R., Miclaus, T., Wang, L., Singh, R., Hayashi, Y., Sutherland, D., Chen, C., Autrup, H. and Beer, C.: Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol. Lett.*, **222**, 55-63 (2013).
- 20) Kim, S., Choi, JE., Choi, J., Chung, KH., Park, K., Yi, J. and Ryu, DY.: Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro*, **23**, 1076-1084 (2009).
- 21) de Gruijl, FR.: Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol.*, **319**, 359-366 (2000).
- 22) Vink, AA. and Roza, L.: Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *J. Photochem. Photobiol. B*, **65**, 101-104 (2001).

- 23) Han, C., Srivastava, AK., Cui, T., Wang, QE. and Wani, AA.: Differential DNA lesion formation and repair in heterochromatin and euchromatin. *Carcinogenesis*, **37**, 129-138 (2016).
- 24) Goodarzi, AA., Noon, AT., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M. and Jeggo, PA.: ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell*, **31**, 167-177 (2008).
- 25) Ogara, MF., Sirkin, PF., Carcagno, AL., Marazita, MC., Sonzogni, SV., Ceruti, JM. and Cánepa, ET.: Chromatin relaxation-mediated induction of p19INK4d increases the ability of cells to repair damaged DNA. *PLoS One*, **8**, e61143 (2013).
- 26) Roth, SY., Denu, JM. and Allis, CD.: Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 81-120 (2001).
- 27) Peterson, CL. and Laniel, MA.: Histones and histone modifications. *Curr. Biol.*, **14**, R546-R551 (2004).
- 28) Choi, O., Deng, KK., Kim, NJ., Ross, LJr., Surampalli, RY. and Hu, Z.: The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.*, **42**, 3066-3074 (2008).
- 29) Lok, CN., Ho, CM., Chen, R., He, QY., Yu, WY., Sun, H., Tam, PK., Chiu, JF. and Che, CM.: Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 527-534 (2007).
- 30) Pal, S., Tak, YK. and Song, JM.: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1712-1720 (2007).
- 31) Suzuki, H., Toyooka, T. and Ibuki, Y.: Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 3018-3024 (2007).
- 32) Holt, KB. and Bard, AJ.: Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry*, **44**, 13214-13223 (2005).

- 33) Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Andrew Wang, Y., Aguilar, ZP. and Wei, H.: Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *Biometals*, **25**, 45-53 (2012).
- 34) Carlson, C., Hussain, SM., Schrand, AM., Braydich-Stolle, LK., Hess, KL., Jones, RL. and Schlager, JJ.: Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13608-13619 (2008).
- 35) Park, HJ., Kim, JY., Kim, J., Lee, JH., Hahn, JS., Gu, MB. and Yoon, J.: Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.*, **43**, 1027-1032 (2009).
- 36) Hwang, ET., Lee, JH., Chae, YJ., Kim, YS., Kim, BC., Sang, BI. and Gu, MB.: Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*, **4**, 746-750 (2008).
- 37) Sotiriou, GA., Meyer, A., Knijnenburg, JT., Panke, S. and Pratsinis, SE.: Quantifying the origin of released Ag⁺ ions from nanosilver. *Langmuir*, **28**, 15929-15936 (2012).
- 38) AshaRani, PV., Low Kah Mun, G., Hande, MP. and Valiyaveetil, S.: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, **3**, 279-290 (2009).
- 39) Ávalos, A., Haza, AI. and Morales, P.: Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. *Folia. Biol. (Praha)*, **61**, 33-42 (2015).
- 40) Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, SM., Schlager, JJ. and Hong, Y.: DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **233**, 404-410 (2008).
- 41) Rogakou, EP., Pilch, DR., Orr, AH., Ivanova, VS. and Bonner, WM.: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5858-5868 (1998).
- 42) Bonner, WM., Redon, CE., Dickey, JS., Nakamura, AJ., Sedelnikova, OA., Solier, S. and Pommier, Y.: GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 957-967 (2008).
- 43) Mah, LJ., El-Osta, A. and Karagiannis, TC.: gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, **4**, 679-686 (2010).

- 44) Zhao, H., Dobrucki, J., Rybak, P., Traganos, F., Dorota Halicka, H. and Darzynkiewicz, Z.: Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using "click chemistry". *Cytometry A*, **79**, 897-902 (2011).
- 45) Chen, JH., Ozanne, SE. and Hales, CN.: Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1140-1148 (2005).
- 46) Sutherland, BM., Bennett, PV., Sidorkina, O. and Laval, J.: Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*, **39**, 8026-8031 (2000).
- 47) Yang, N., Galick, H., Wallace, SS.: Attempted base excision repair of ionizing radiation damage in human lymphoblastoid cells produces lethal and mutagenic double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1323-1334 (2004).
- 48) Harrison, L., Hatahet, Z. and Wallace, SS.: In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites. *J. Mol. Biol.*, **3**, 667-684 (1999).
- 49) Hartwig, A.: Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.*, **3**, 45-50 (1994).
- 50) Uddin, AN., Burns, FJ., Rossman, TG., Chen, H., Kluz, T. and Costa, M.: Dietary chromium and nickel enhance UV-carcinogenesis in skin of hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **221**, 329-338 (2007).
- 51) Rossman, TG., Uddin, AN., Burns, FJ. and Bosland, MC.: Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **176**, 64-71 (2001).
- 52) Hartwig, A., Blessing, H., Schwerdtle, T. and Walter, I.: Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology*, **193**, 161-169 (2003).
- 53) Begley, TJ. and Samson, LD.: Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1123-1132 (2004).
- 54) Ding, W., Liu, W., Cooper, KL., Qin, XJ., de Souza Bergo, PL., Hudson, LG. and Liu, KJ.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *J. Biol. Chem.*, **284**, 6809-6817 (2009).

- 55) Kain, J., Karlsson, HL. and Möller, L.: DNA damage induced by micro- and nanoparticles--interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis*, **27**, 491-500 (2012).
- 56) Asharani, PV., Sethu, S., Lim, HK., Balaji, G., Valiyaveetil, S. and Hande, MP.: Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr.*, **3**, 2 (2012).
- 57) Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G. and Hoet, P.: Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre Toxicol.*, **6**, 14 (2009).
- 58) Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Kähkönen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V. and Kahru, A.: Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One*, **9**, e102108 (2014).
- 59) Braakhuis, HM., Gosens, I., Krystek, P., Boere, JA., Cassee, FR., Fokkens, PH., Post, JA., van Loveren, H. and Park, MV.: Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.*, **11**, 49 (2014).
- 60) Cortese-Krott, MM., Münchow, M., Pirev, E., Hessner, F., Bozkurt, A., Uciechowski, P., Pallua, N., Kröncke, KD. and Suschek, CV.: Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1570-1577 (2009).
- 61) Hossain, Z. and Huq, F.: Studies on the interaction between Ag(+) and DNA. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 398-404 (2002).
- 62) Kittler, S., Greulich, C., Gebauer, JS., Diendorf, J., Treuel, L., Ruiz, L., Gonzalez-Calbet, JM., Vallet-Regi, M., Zellner, R., Koller, M. and Epple, M.: The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J. Mater. Chem.*, **20**, 512-518 (2010).

- 63) Rahn, RO. and Landry, LC.: Ultraviolet irradiation of nucleic acids complexed with heavy atoms. II. Phosphorescence and photodimerization of DNA complexed with Ag. *Photochem. Photobiol.*, **18**, 29-38 (1973).
- 64) de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L. and Cleaver, JE.: A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6870-6875 (2010).
- 65) Tommasi, S., Denissenko, MF. and Pfeifer, GP.: Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Res.*, **57**, 4727-4730 (1997).
- 66) Mitchell, DL.: Effects of cytosine methylation on pyrimidine dimer formation in DNA. *Photochem. Photobiol.*, **71**, 162-165 (2000).
- 67) Becker, MM. and Wang, Z.: Origin of ultraviolet damage in DNA. *J. Mol. Biol.*, **210**, 429-438 (1989).
- 68) Nordén, B., Matsuoka, Y. and Kurucsev, T.: Nucleic acid-metal interactions. IV. Complexes of Ag(I) with thymine and cytosine from studies of UV and IR dichroic spectra. *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.*, **16**, 217-226 (1986).
- 69) Dattagupta, N. and Crothers, DM.: Solution structural studies of the Ag(I)-DNA complex. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2971-2985 (1981).
- 70) Pfeifer, GP., Drouin, R., Riggs, AD. and Holmquist, GP.: Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1798-1804 (1992).
- 71) Liu, X., Conconi, A. and Smerdon, MJ.: Strand-specific modulation of UV photoproducts in 5S rDNA by TFIIIA binding and their effect on TFIIIA complex formation. *Biochemistry*, **36**, 13710-13717 (1997).
- 72) Selleck, SB. and Majors, J.: Photofootprinting in vivo detects transcription-dependent changes in yeast TATA boxes. *Nature*, **325**, 173-177 (1987).
- 73) Aboussekhra, A. and Thoma, F.: TATA-binding protein promotes the selective formation of UV-induced (6-4)-photoproducts and modulates DNA repair in the TATA box. *EMBO J.*, **18**, 433-443 (1999).

- 74) Tornaletti, S. and Pfeifer, GP.: UV light as a footprinting agent: modulation of UV-induced DNA damage by transcription factors bound at the promoters of three human genes. *J. Mol. Biol.*, **249**, 714-728 (1995).
- 75) Halicka, HD., Huang, X., Traganos, F., King, MA., Dai, W. and Darzynkiewicz, Z.: Histone H2AX Phosphorylation after Cell Irradiation with UV-B Relationship to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Cell Cycle*, **4**, 339-345 (2005).
- 76) Hanasoge, S. and Ljungman, M.: H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, **28**, 2298-2304 (2007).
- 77) Matsumoto, M., Yaginuma, K., Igarashi, A., Imura, M., Hasegawa, M., Iwabuchi, K., Date, T., Mori, T., Ishizaki, K., Yamashita, K., Inobe, M. and Matsunaga, T.: Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J. Cell Sci.*, **120**, 1104-1112 (2007).
- 78) Berti, L., Alessandrini, A. and Facci, P.: DNA-templated photoinduced silver deposition. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11216-11217 (2005).
- 79) Jung, YL., Jung, C., Park, JH., Kim, MI. and Park, HG.: Direct detection of unamplified genomic DNA based on photo-induced silver ion reduction by DNA molecules. *Chem. Commun. (Camb)*, **49**, 2350-2352 (2013).
- 80) Paull, TT., Rogakou, EP., Yamazaki, V., Kirchgesser, CU., Gellert, M. and Bonner, WM.: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, **10**, 886-895 (2000).
- 81) Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M. and Köller, M.: Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.*, **7**, 347-354 (2011).
- 82) Smythe, E. and Ayscough, KR.: Actin regulation in endocytosis. *J. Cell Sci.*, **119**, 4589-4598 (2006).
- 83) Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, H., Tatsuka, M., Takahashi, M., Nagata, K. and Inagaki, M.: Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1489-1500 (2003).

- 84) Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, MK. and Lappalainen, P.: Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 649-664 (2005).
- 85) Thomson, S., Clayton, AL. and Mahadevan, LC.: Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol. Cell*, **8**, 1231-1241 (2001).
- 86) Drobic, B., Pérez-Cadahía, B., Yu, J., Kung, SK. and Davie, JR.: Promoter chromatin remodeling of immediate-early genes is mediated through H3 phosphorylation at either serine 28 or 10 by the MSK1 multi-protein complex. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 3196-3208 (2010).
- 87) Choi, HS., Choi, BY., Cho, YY., Mizuno, H., Kang, BS., Bode, AM. and Dong, Z.: Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is indispensable for neoplastic cell transformation. *Cancer Res.*, **65**, 5818-5827 (2005).
- 88) Kim, HG., Lee, KW., Cho, YY., Kang, NJ., Oh, SM., Bode, AM. and Dong, Z.: Mitogen- and stress-activated kinase 1-mediated histone H3 phosphorylation is crucial for cell transformation. *Cancer Res.*, **68**, 2538-2547 (2008).
- 89) Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, MA. and Allis, CD.: Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109 (1999).
- 90) Hendzel, MJ., Wei, Y., Mancini, MA., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, BR., Bazett-Jones, DP. and Allis, CD.: Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348-360 (1997).
- 91) Li, J., Gorospe, M., Barnes, J. and Liu, Y.: Tumor promoter arsenite stimulates histone H3 phosphoacetylation of proto-oncogenes c-fos and c-jun chromatin in human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13183-13191 (2003).
- 92) Ke, Q., Li, Q., Ellen, TP., Sun, H. and Costa, M.: Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK-MAPK pathway *Carcinogenesis*, **29**, 1276-1281 (2008).

- 93) Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, GR., Rampersaud, N., Dyson, MH., Hazzalin, CA., Mahadevan, LC. and Arthur, JS.: MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.*, **22**, 2788-2797 (2003).
- 94) Anest, V., Hanson, JL., Cogswell, PC., Steinbrecher, KA., Strahl, BD. and Baldwin, AS.: A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependent gene expression. *Nature*, **423**, 659-663 (2003).
- 95) Lo, WS., Duggan, L., Emre, NC., Belotserkovskya, R., Lane, WS., Shiekhattar, R., Berger, SL.: Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, **293**, 1142-1146 (2001).
- 96) Hsu, JY., Sun, ZW., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, DK., Grushcow, JM., Brame, CJ., Caldwell, JA., Hunt, DF., Lin, R., Smith, MM. and Allis, CD.: Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291 (2000).
- 97) Fu, J., Bian, M., Jiang, Q. and Zhang, C.: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.*, **5**, 1-10 (2007).
- 98) Ibarra, N., Pollitt, A. and Insall, RH.: Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1243-1246 (2005).
- 99) Tsukahara, T., Tanno, Y. and Watanabe, Y.: Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*, **467**, 719-723 (2010).
- 100) Latham, JA. and Dent, SY.: Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1017-1024 (2007).
- 101) Kouzarides, T.: Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705 (2007).
- 102) Metcalfe, S., Weeds, A., Okorokov, AL., Milner, J., Cockman, M. and Pope, B.: Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin. *Oncogene*, **18**, 2351-2355 (1999).
- 103) Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, CP., Okorokov, AL., Mee, T. and Milner, J.: p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene*, **20**, 5449-5458 (2001).

- 104) Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J.: Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.*, **7**, 823-839 (2005).
- 105) Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D. and Yang, H.: ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.*, **2**, 1-35 (2005).
- 106) Lankoff, A., Sandberg, WJ., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Refsnes, M., Sartowska, B., Schwarze, PE., Meczynska-Wielgosz, S., Wojewodzka, M. and Kruszewski, M.: The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol. Lett.*, **208**, 197-213 (2012).
- 107) Kocbek, P., Teskac, K., Kreft, ME. and Kristl, J.: Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small*, **6**, 1908-1917 (2010).
- 108) Sohaebuddin, SK., Thevenot, PT., Baker, D., Eaton, JW. and Tang, L.: Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.*, **7**, 22 (2010).

本論文を構成する報文

[主論文]

1. Zhao, X., Toyooka, T. and Ibuki, Y.: Synergistic bactericidal effect by combined exposure to Ag nanoparticles and UVA. *Sci. Total Environ.*, **458-460**, 54-62 (2013).
2. Zhao, X., Toyooka, T. and Ibuki, Y.: Silver ions enhance UVB-induced phosphorylation of histone H2AX. *Environ. Mol. Mutagen.*, **55**, 556-565 (2014).
3. Zhao, X. and Ibuki, Y.: Evaluating the toxicity of silver nanoparticles by detecting phosphorylation of histone H3 in combination with flow cytometry side-scattered light. *Environ. Sci. Technol.*, **49**, 5003-5012 (2015).
4. Zhao, X., Takabayashi, F. and Ibuki, Y.: Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. *J. Photochem. Photobiol. B*, **162**, 213-222 (2016).

[参考論文]

1. Ibuki, Y., Toyooka, T., Zhao, X. and Yoshida, I.: Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis*, **35**, 1228-1237 (2014).
2. Kubota, T., Toyooka, T., Zhao, X. and Ibuki, Y.: Phosphorylation of histone H2AX generated by linear alkylbenzene sulfonates and its suppression by UVB exposure. *Photochem. Photobiol.*, **90**, 845-852 (2014).
3. Zhao, X., Toyooka, T., Kubota, T., Yang, G. and Ibuki, Y.: γ -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. *Mutat. Res.*, **777**, 33-42 (2015).
4. Zhao, X., Toyooka, T. and Ibuki, Y.: New mechanism of γ -H2AX generation: Surfactant-induced actin disruption causes deoxyribonuclease I translocation to the nucleus and forms DNA double-strand breaks. *Mutat. Res.*, **794**, 1-7 (2015).