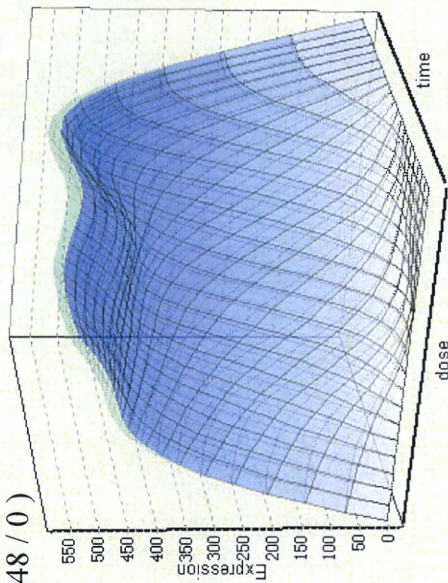


5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG/QPCR結果比較

遺伝子Cyp1a2の比較

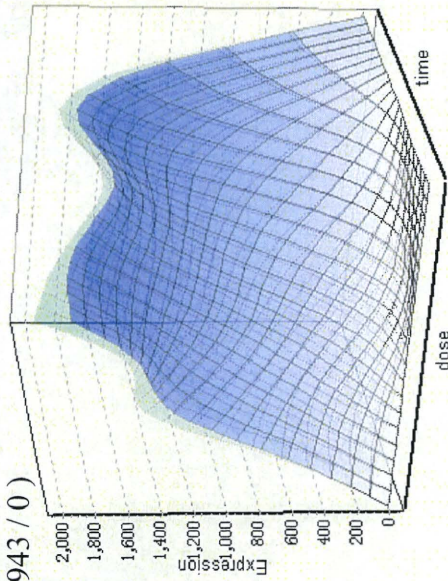
MAS5

TTG020-L_SpNC_0_22217_a_at
Cyp1a2
(548 / 0)



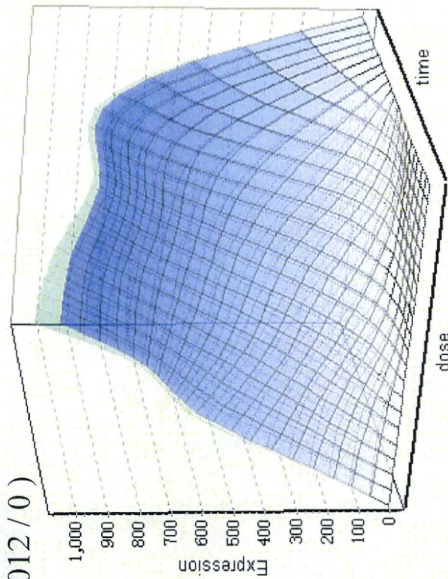
MLANG

perclin_TTG020-L_20140126
Cyp1a2
(1943 / 0)



QPCR

TTG020-L_QPCR_SpNC_0_4
Cyp1a2
(1012 / 0)



MAS5では、飽和により、8hや24hの形状が分からないが、MLANGは24hまで、mRNAが増加していることまで補正できている。

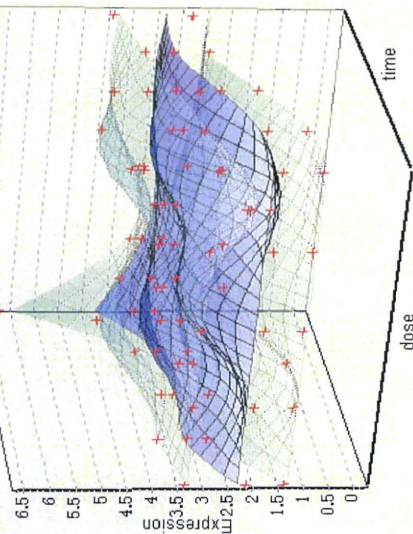
5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較



MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロブセットの例 (1460444_at : Arrb1)

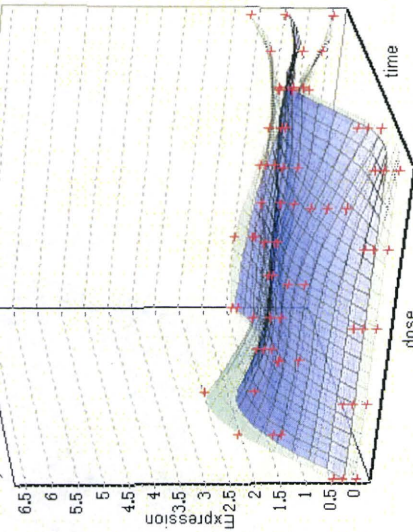
MAS5

TTG020-L_SpNC_1460444_at
Arrb1
(6 / 0)



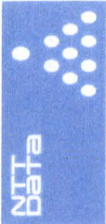
MLANG

perclin_TTG020-L_1460444_at
Arrb1
(6 / 0)



MAS5では、制御を受けていない変動とみえるが、MLANGではSDが小さく制御を受けている変動を示している

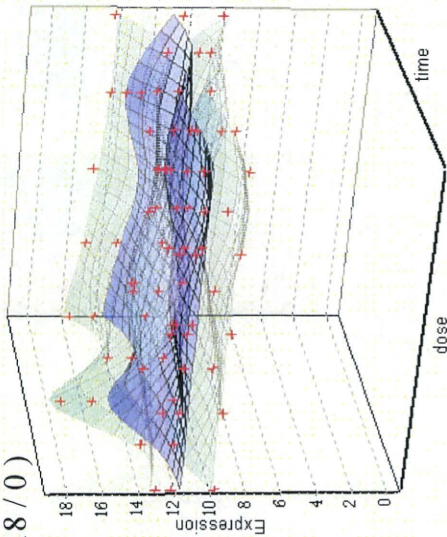
5. 係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較



MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロブセットの例 (1452700_s_at : Kbtbd7)

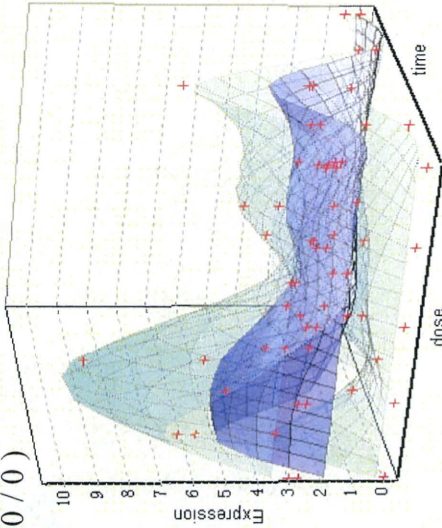
MAS5

TTG020-L_SpNC1452700_s_at
Kbtbd7
(18 / 0)



MLANG

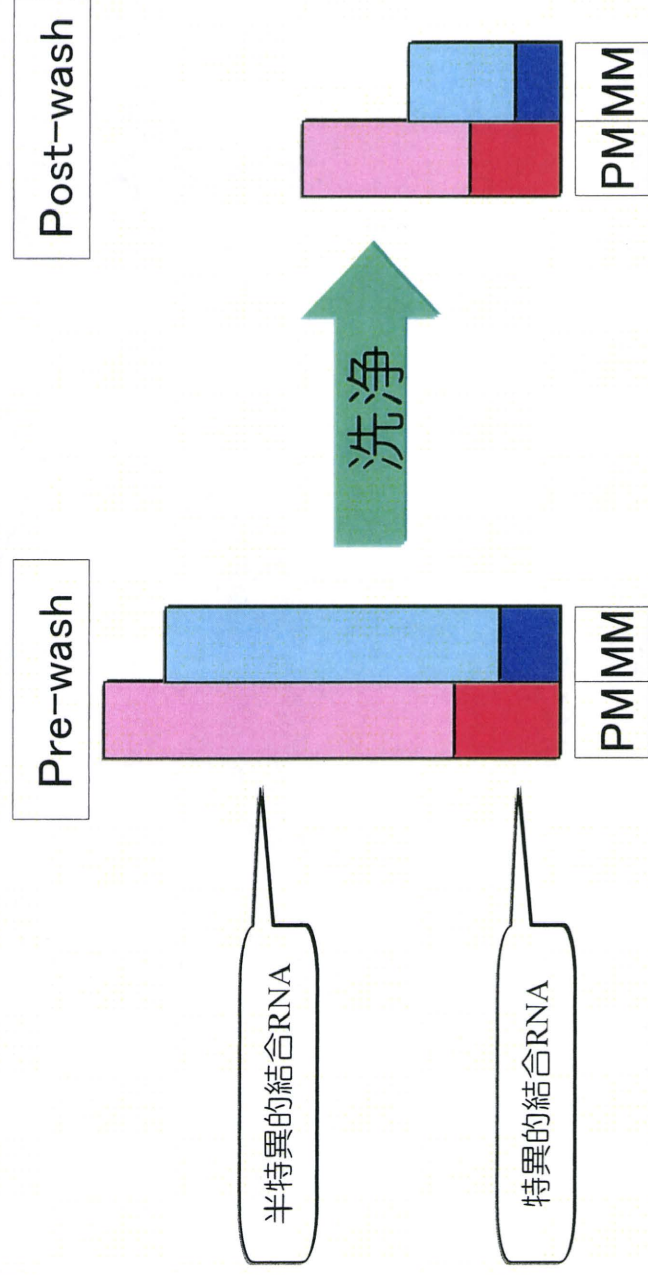
perclin_TTG020-L_452700_s_at
Kbtbd7
(10 / 0)



MAS5では、12コピー程度存在し制御を受けていないようにみえる。MLANGでは、4hでピークを示すサーカディアンらしき変動が存在するようにみえる

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1460444_at : Arrb1、1452700_s_at : Kbtbd7の結果を導くと想定される現象



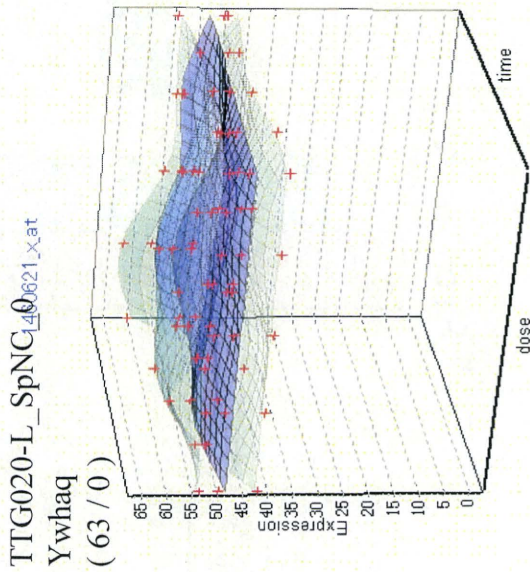
特異的結合RNAと比較して、離脱速度の差異が小さい半特異的結合RNAが多く存在する

半特異的結合RNAが洗浄されずに蛍光値として観測されるため、MAS5では半特異的結合RNAの発現をプローブセットの発現値としてみない可能性がある

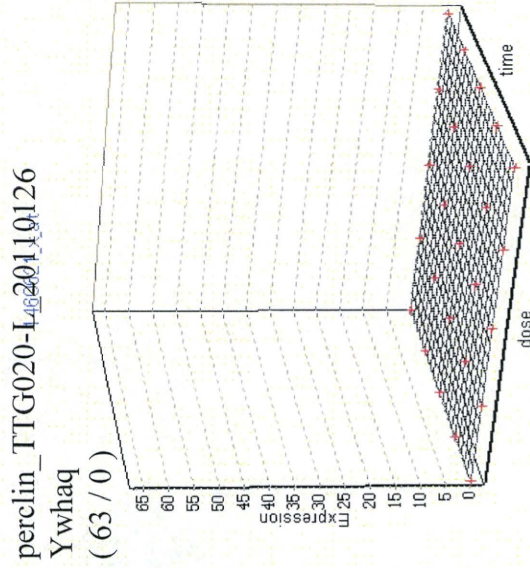
5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプローブセットの例 (1460621_x_at : Ywhaq)

MAS5



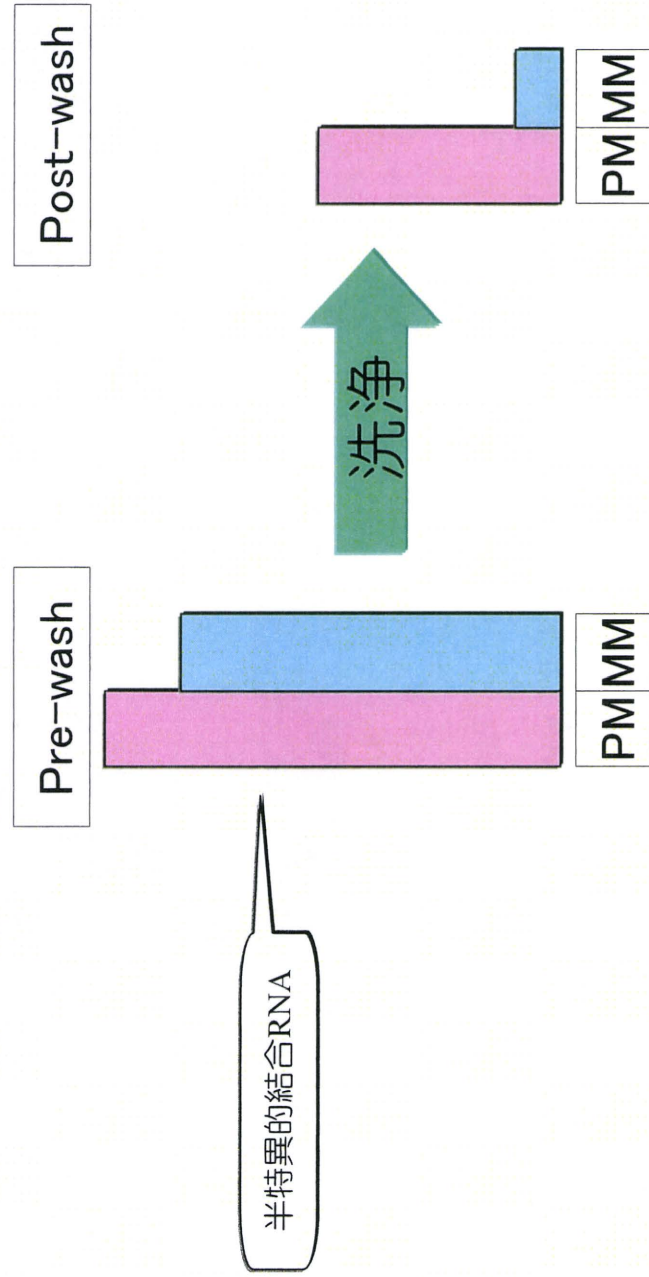
MLANG



MAS5では、50コピー程度の発現量となっていたが、MLANGでは、発現量0と推定された。

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1460621_x_at : Ywhaqの結果を導くと想定される現象



特異的結合RNAと比較して離脱速度の差異が小さく、濃度の高い半特異的結合RNAが存在し、特異的結合RNAが存在しない場合

半特異的結合RNAが洗浄で残り蛍光値として観測されるため、MAS5では半特異的結合RNAの蛍光強度をプローブセットの発現値としてみなされた可能性がある

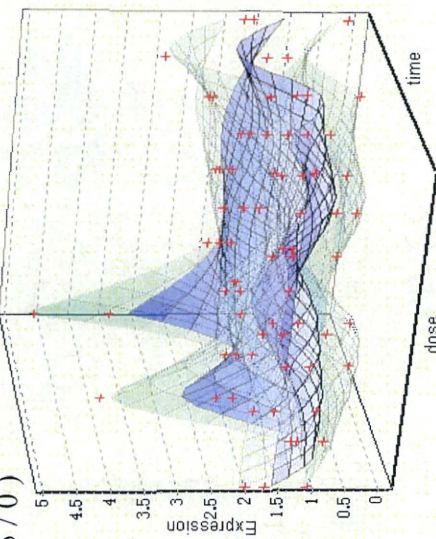
5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較



MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロープセットの例 (1457423_x_at : Nalcn)

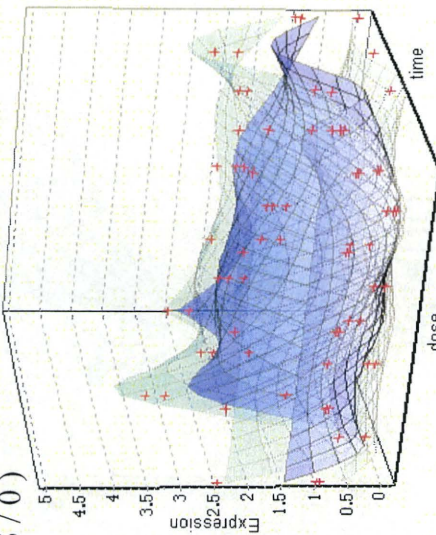
MAS5

TTG020-L_SpNC_1457423_at
LOC675405 /// Nalcn
(5 / 0)



MLANG

perclin_TTG020-L_1457423_at
LOC675405 /// Nalcn
(5 / 0)



MAS5では、Dose方向での変動が大いだが、MLANGでは、Dose方向での変動が少なく、サーカディアンらしき変動が現れており、化合物の影響を受けない遺伝子として認識できる。

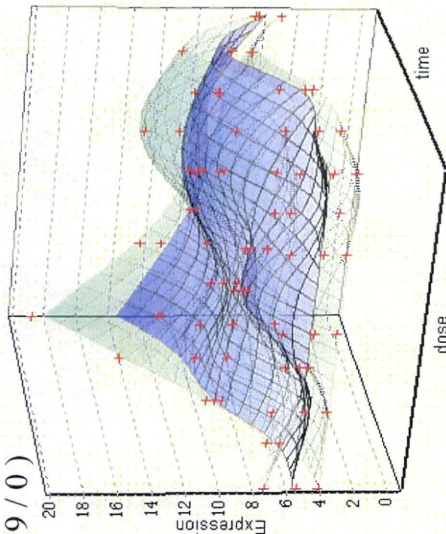
5. 係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較



MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロブセットの例 (1452291_at : Arap2)

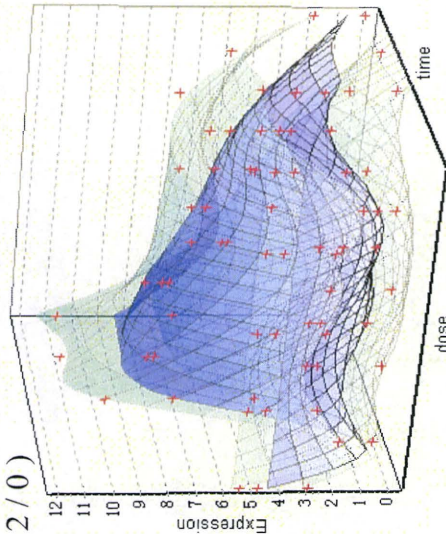
MAS5

TTG020-L_SpNC_1452291_at
Arap2
(19 / 0)



MLANG

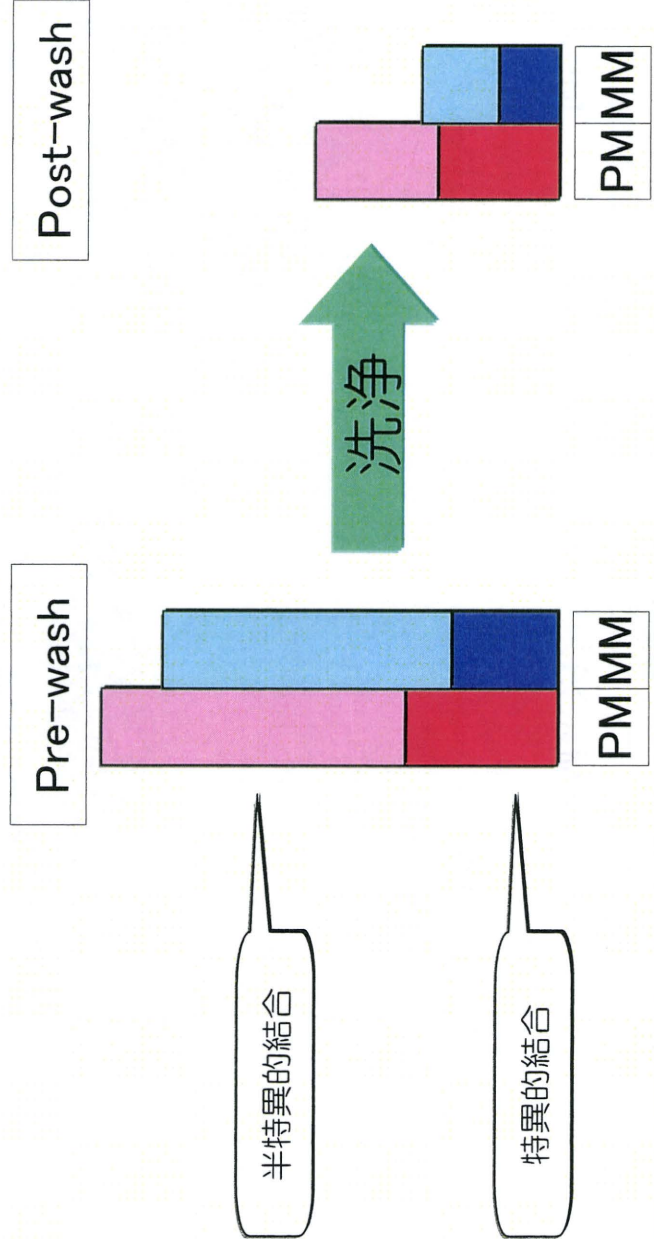
perclin_TTG020-L_4204140126
Arap2
(12 / 0)



MAS5では、制御を受けていないようにみえる。MLANGでは、化合物の影響により、2h下がりが8hで上がる制御を受けているとみえる

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1457423_x_at : Nalcn、 1452291_at : Arap2結果を導くと想定される現象



特異的結合RNAと比較して、離脱速度と濃度のバランスのとれた半特異的結合RNAが存在する場合

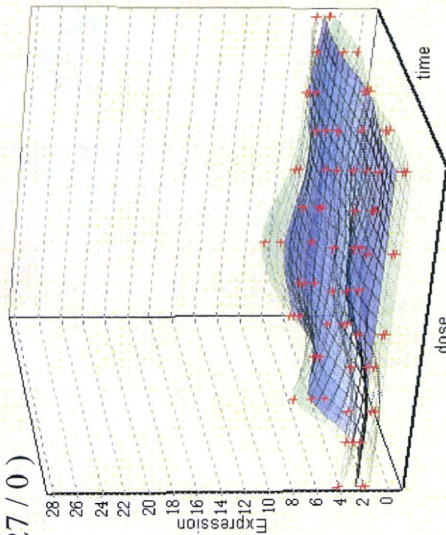
洗浄後に、特異的RNAと半特異的RNAが同程度量残ると、MAS5では、PM/MMの特異的結合、半特異的結合を区別していないため、MAS5の推定値が若干高く、不安定な結果となる

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロセッサの例 (1456149_at : D11Bwg0517e)

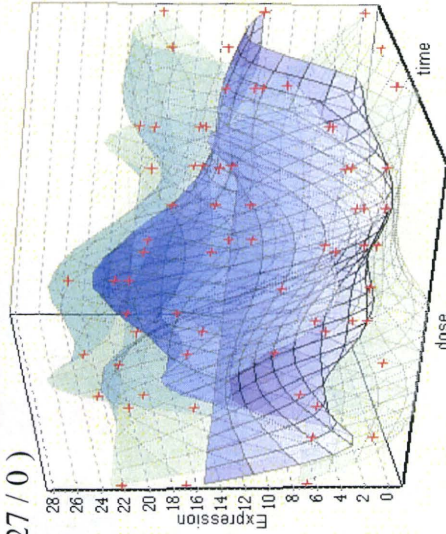
MAS5

TTG020-L_SpNC_1456149_at
D11Bwg0517e
(27/0)



MLANG

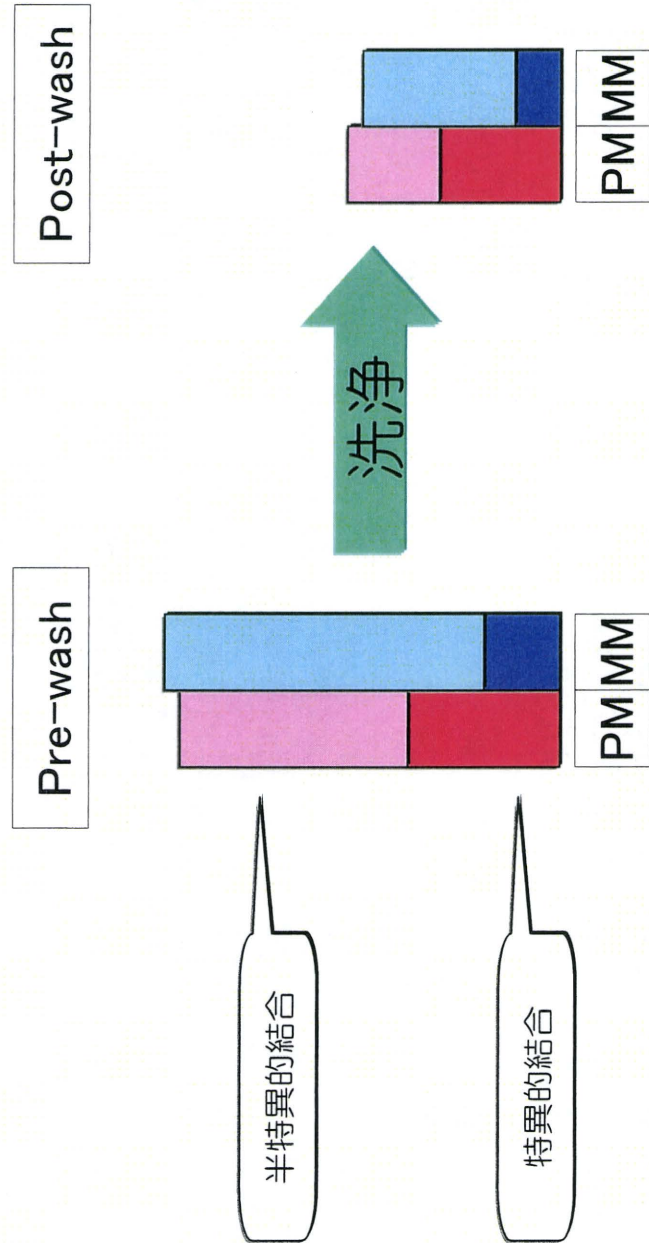
perclin_TTG020-L_20110126
D11Bwg0517e
(27/0)



MAS5では、3コピー程度の発現で、制御を受けていないようにみえる。MLANGでは、10コピー以上の発現があり、制御を受けた変動と思われる

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1456149_at : D11Bwg0517eの結果を導くと想定される現象



MM側に半特異的結合しやすいRNAが存在して、洗浄後にPMとMMが同程度残る場合

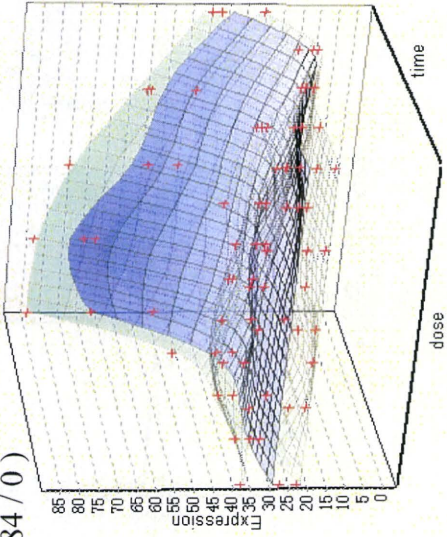
洗浄後に、特異的結合と半特異的結合が同程度量残ると、MAS5では、PM/MMの差異を用いて発現量を計算するので、小さな値を示す。

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロセッサの例 (1456125_a_at : Dynll1)

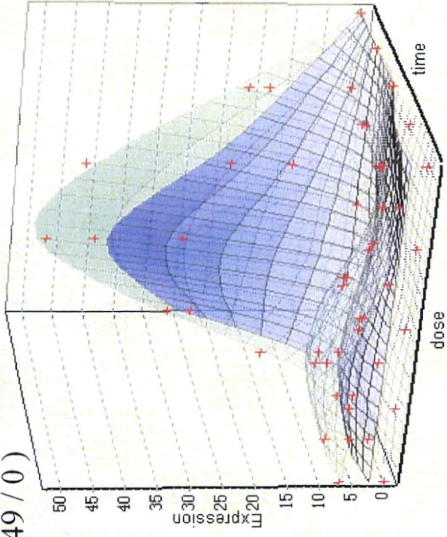
MAS5

TTG020-L_SpNC₄₀125_a_at
Dynll1 /// Gm6788
(84 / 0)



MLANG

perclin_TTG020-L₄₀20110126
Dynll1 /// Gm6788
(49 / 0)



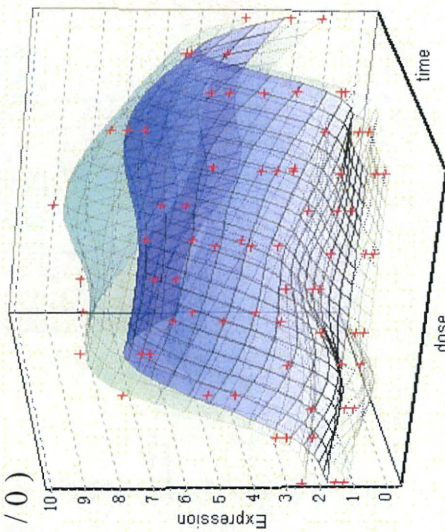
MAS5では、通常30コピー程度の発現があり、24時間で発現しているようにみえる。
MLANGでは、通常発現しておらず、化合物影響として24時間で発現しているとみえる。

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

MAS5/MLANGで異なる変動と思われるプロープセットの例 (1452766_at : Tppp)

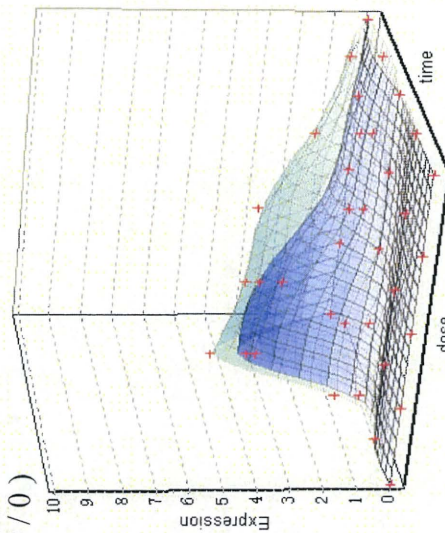
MAS5

TTG020-L_SpNC_1452766_at
Tppp
(9/0)



MLANG

perclin_TTG020-L_1452766_at
Tppp
(9/0)

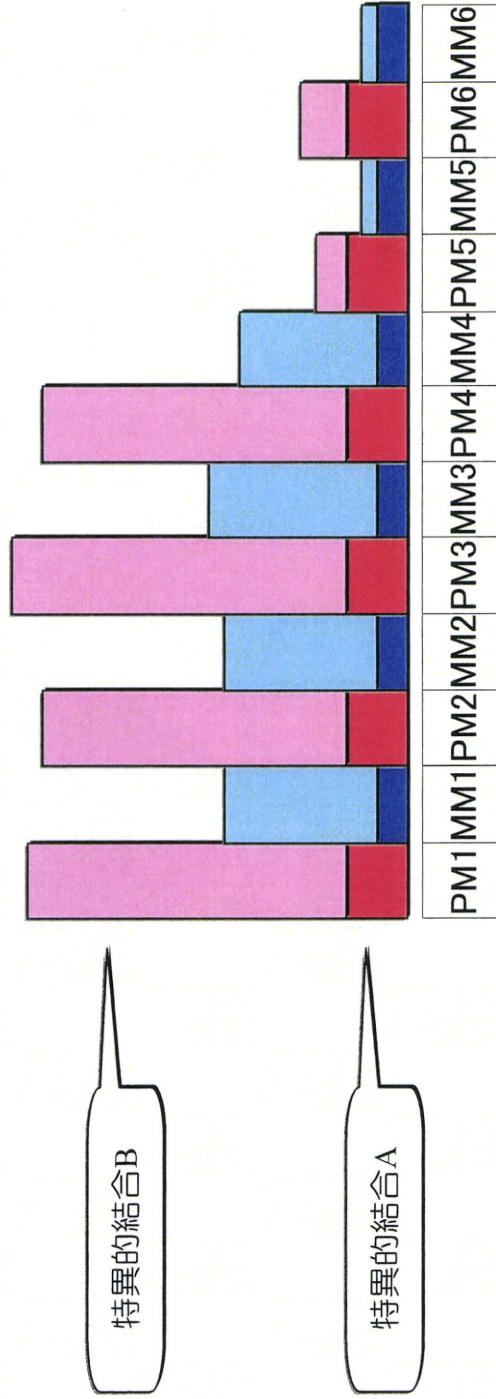


MAS5では、サーカディアンらしき変動をしているとみえる。MLANGでは、通常発現しておらず、化合物影響として8時間で発現しているとみえる。

5.係数学習後の補正性能 MAS5/MLANG結果比較

1456125_a_at : Dynll1および1452766_at : Tpppの結果を導くと想定される現象

洗浄後プローブセット



スライシングバリアントなどが存在する場合

MAS5では、プローブセット内でMedianを用いて発現値を計算するため、多くのプローブを占める発現値に近い値が推定値となる。図の場合には特異的結合Bによる蛍光値が中心である。MLANGでは、学習の結果どちらが中心となるか決定される。

6.まとめ

高発現域

MASSでは、補正できていない飽和状態の遺伝子を補正できた

QPCRと比較し確認した。

低発現域

MASSと発現パターンが異なる遺伝子が多く存在した

半特異的結合による説明が可能か確認した。

残念ながら、MLANGによる推定値とMASSによる推定値のどちらがより真の値に近いかをこれらの推定値だけから判定することは困難である。

今後の課題

真の値に近いならば、遺伝子の特性を示す値が豊富に得られるはずであると考え、多くの実験結果に対してMLANGによる補正を実施し、単に化合物の影響だけでなく、餌、季節、溶媒などの影響が実験結果から抽出可能か確認する。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

人への外挿にかかわる基礎的及び臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による
毒性応答メカニズムの研究
—経気道曝露モデルに対応した化学物質のヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響—

研究分担者 慶長直人

国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長

研究協力者 松下育美 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部
土方美奈子 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部

研究要旨

環境中の化学物質を吸入することによって、人体に有害な影響が現れることは、現象論的に広く知られているが、そのメカニズムは、必ずしも十分に明らかではない。したがって、そのモデル系を確立することは、対策を講じる上で重要である。ヒトの肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されているため、このような状況に、吸入化学物質が加わり、相乗的に気道系の炎症が惹起されることが想定される。初年度、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、細菌性リポ多糖ないし poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討し、poly I:C (10 µg/ml) で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド (10 µM) 3 時間添加することにより、インターロイキン 8 (IL-8) mRNA 発現量が有意に増強することを報告した。次年度は、逆に、化学物質の慢性的な吸入曝露の状況下で、外界の吸入粉塵や微生物の刺激を受けて生じる応答が修飾される場合を想定して、ホルムアルデヒド (1-10 µM) 添加 3 時間、その後 poly I:C (10 µg/ml) 12 時間刺激の系で相乗効果が認められた。しかしながら、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》に比べると、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の系では、必ずしも再現性よく IL-8 の遺伝子発現増強効果あるいは、培養上清中のサイトカインの増加が認められなかった。最終年度は、これらの事象の上流にある、IL-8 遺伝子発現のシグナル伝達に関連するタンパクのリン酸化 (ERK, p38, JNK) におよぼす、ホルムアルデヒドの効果について検討した。

A. 研究目的

呼吸器官である肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、化学物質を吸入した場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。これまで、文献上、ホルムアルデヒドの曝露により、*in vitro*で、気道上皮細胞の炎症応答が増強される可能性が知られていたため、我々は、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用いて、ウイルス曝露を念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR の系で検討した。一方、逆に、化学物質の慢性的な吸入曝露の状況下で、外界の吸入粉塵や微生物の刺激を受けて生じる応答が修飾される場合を想定して、ホルムアルデヒドを添加してから、poly I:C 刺激を加える系についてもさまざまな条件検討を行ったが、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の方が、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の系より、顕著に、インターロイキン 8 (IL-8) の遺伝子発現増強効果が認められた。最終年度は、これらの事象のより上流にあるシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を加えた。

B. 研究方法

「刺激物質」

これまでの検討から、外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、作用機作がよく検討されており、構造の単純な、Poly I:C を選択した。

「気道上皮細胞」

これまでの検討から、ヒト気道上皮細胞株

BEAS2B を用い、培養、予備実験を行った。

「細胞培養および刺激系」

細胞株を 25 cm² フラスコで培養し (5×10⁵ cells /flask)、90% confluent で、ホルムアルデヒド (1, 10 μM) を添加 3-24 時間後、Poly I:C (1, 10 μg/ml) の刺激を加え、さらに 12 時間後に細胞を回収、RNA を抽出し、定量的 RT/PCR を実施した。

「シグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting」

培養・刺激後の細胞を、脱リン酸化阻害剤を添加した Lysis Buffer に溶解、遠心分離した上清をサンプルとした。サンプルを限外ろ過にて濃縮後、20 μg を SDS sample buffer に溶解、200V、50~60 分電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、引き続き polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に 20% メタノール含有の blotting buffer にて 160 mA、35 分で転写した。転写膜を 5% skim milk/TBS-T (1×TBS、0.1% Tween-20) で室温、1 時間ブロッキング後、各々推奨希釈濃度に 5%BSA/TBS-T にて希釈したリン酸化タンパク質特異的の一次抗体 (p38MAPK, ERK1/2 及び JNK) とともに 4℃、一晚震盪した。次に、PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体を含む 5%BSA/TBS-T 中で室温、1 時間インキュベートした。検出は、化学発光 (ECL plus もしくは ECL Advance) により、CCD カメラにて画像取得後、Quantity One ソフトウェアを用いて解析を行った。

これまでのサイトカイン、ケモカインパネルを用いた検討から、ホルムアルデヒドの

効果を検討するための、代表的炎症マーカー遺伝子として、IL-8を用いた。

(倫理面への配慮)

これまでの検討では、個人に由来するヒト検体を用いておらず、公に入手される細胞株を用いている。

C. 研究結果

「実験条件の再検討」

シックハウス症候群の主要症状のひとつに、喘息の誘発など気道炎症を疑わせる症状が認められることから、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 細胞を用いた。Poly I:C (10 $\mu\text{g/ml}$) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (1, 10 μM) を添加、一定時間後 (mRNA 発現は 3 時間後) に細胞を回収し、解析する《poly I:C \Rightarrow ホルムアルデヒド》の系と、ホルムアルデヒド (1, 10 μM) 添加 3 時間後、ホルムアルデヒド曝露を継続し、Poly I:C (10 $\mu\text{g/ml}$) の存在下、一定時間後 (mRNA 発現は 12 時間後) に細胞を回収する《ホルムアルデヒド \Rightarrow polyI:C》を並行して検討を加えた。

《poly I:C \Rightarrow ホルムアルデヒド》の系では、ホルムアルデヒド 10 μM 以上で、IL-8 mRNA の発現亢進が観察されたが、《ホルムアルデヒド \Rightarrow polyI:C》の系では、必ずしも再現性が良好でなかった。

「シグナル伝達分子の解析」

IL-8 の遺伝子発現へ至細胞内シグナル伝達分子への影響を見る目的で、p38MAPK, ERK1/2, JNK のリン酸化を 0, 15, 30, 60, 120 分まで観察して、poly I:C 刺激による

各タンパクリン酸化を確認したところ、JNK のリン酸化が、いずれの条件下でも、ホルムアルデヒド添加により、亢進する傾向が認められた (図 1)。

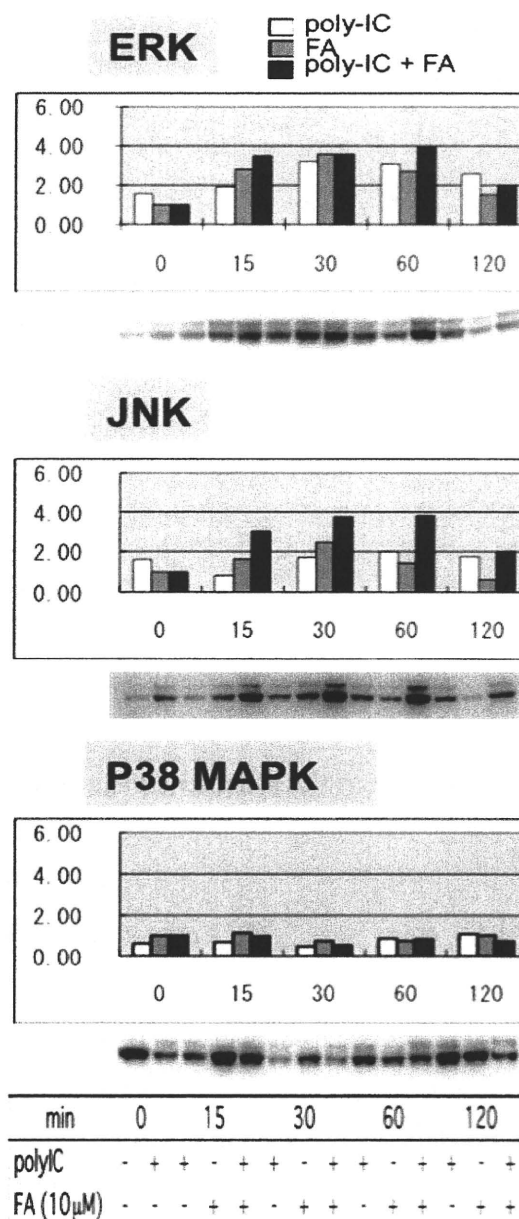


図 1 気道上皮細胞刺激時のシグナル伝達におけるホルムアルデヒドの増強効果の検討

《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系にて、ホルムアルデヒド(10 μM)添加後、0分から120分まで、ERK, JNK, P38MAPKのリン酸化をwestern blottingにより検出。グラフは0分を1としたときの相対値。poly I:C単独に比べて、poly I:C+ホルムアルデヒド(15分から60分)で、JNKのリン酸化の亢進が認められた。

D. 考察

初年度、ホルムアルデヒドのヒト気道上皮細胞への影響を株化細胞である BEAS-2B 株により、確認したが、特に poly I:C の低濃度刺激後に、ホルムアルデヒドの曝露があると《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》、IL-8 mRNA 発現が誘導されることを確認した。次年度、逆に、ホルムアルデヒド曝露中に、poly I:C 刺激を与えることにより、poly I:C 単独に比べて、炎症応答が増強されるかを検討し《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》、実験を繰り返したが、おそらくホルムアルデヒドによる炎症応答増強効果と、細胞障害による直接の非特異的抑制効果の強弱により、ばらつきのある結果が得られるものと思われた。

動物吸入曝露モデルとの対応を考えると、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》より、《ホルムアルデヒド⇒poly I:C》の方がより、生理的な系と思われるが、この系の再現性の困難さより、断念し、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、ホルムアルデヒドの増強効果がいかなる刺激伝達系を介しているものかどうかを検討した。

その結果、IL-8 遺伝子発現に関わると報告されている ERK, p38, JNK のリン酸化のう

ち、ホルムアルデヒドは、JNK のリン酸化を亢進して、遺伝子発現増強に寄与する可能性が強く示唆された (図2)。

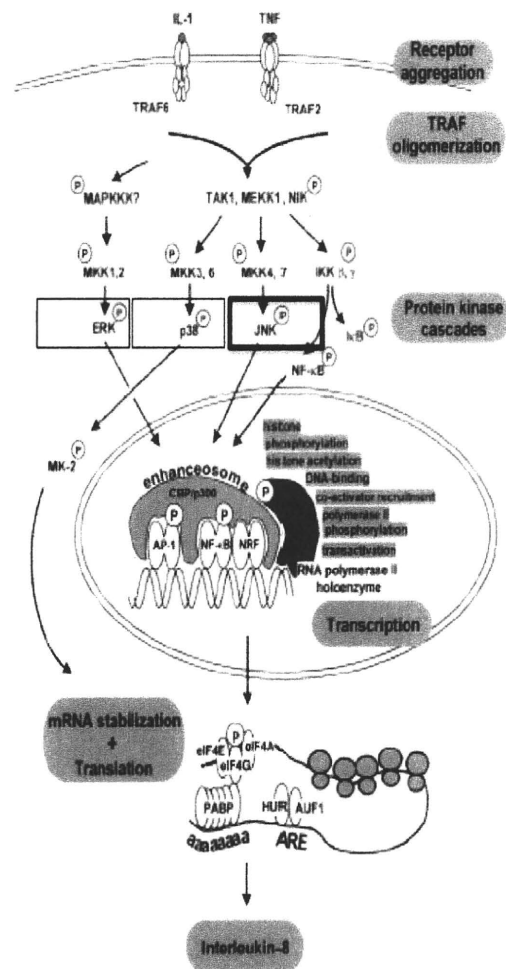


図2 IL-8 発現に関わるシグナル伝達経路 ERK, p38, JNK がそれぞれ関与する系が認められる (Hoffmann E, et al. J Leukoc Biol. 2002;72(5):847-55.)。

E. 結論

ホルムアルデヒド曝露に、poly I:C を刺激したことによる、ヒト気道上皮細胞における炎症応答の相乗効果を、種々の条件下

で検討した結果、ヒト気道上皮細胞株では、ホルムアルデヒドによるケモカインの遺伝子発現増強効果が認められたが、《ホルムアルデヒド⇒polyI:C》の系では、非特異的遺伝子発現抑制効果と《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》で見られた遺伝子発現増強効果が複合しており、結果を複雑にしているものと思われた。

これらのホルムアルデヒドによる炎症性遺伝子発現増強効果については、シグナル伝達分子のリン酸化の検討により、JNK を介した系が関与して可能性が推測された。

このように、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》で見られた遺伝子発現増強効果については、さらに検討を進め、ホルムアルデヒド以外の化学物質の効果、IL-8 以外の遺伝子発現の変化についての網羅的解析、動物モデルとの対比などが必要と思われた

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuyama M, Miura Y, Kiwamoto T, Moriya A, Kokuho N, Shimizu K, Otsuka S, Hijikata M, Keicho N, Hayashihara K, Saito T. A case of familial pulmonary Mycobacterium avium complex disease. Internal Med 49 (10): 949-53, 2010.

Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Promjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K. Association analysis of susceptibility

candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis. Genes Immun 11: 416-22, 2010.

2. 学会発表

松下育美, 土方美奈子, 伊藤秀幸, 慶長直人. 微生物関連物質の低濃度曝露下でヒト気道上皮細胞の炎症応答に化学物質であるホルムアルデヒドが与える影響についての検討. : 第50回日本呼吸器学会総会, 4月23日-25日, 京都, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし