

により測定しながら培地交換を行い、TEER 値が安定するまで 6 日から 7 日程度培養した。TEER 値が安定した段階で培地交換を行ってから TJ binder 添加、12 時間、24 時間後、TEER 値を測定し、サンプル添加時 (0 時間) の TEER 値に対する相対値を算出した。

3. RNA の抽出、品質検査

RNA later 試薬により細胞を回収し、溶解した細胞からの RNA 抽出は、RNesay mini kit (QIAGEN) のプロトコルに従って行った。抽出された RNA は UV 吸収測定とバイオアナライザにより品質検査を行い、マイクロアレイ解析に用いることができる十分な濃度と純度が得られたことを確認した。抽出した RNA から cDNA の合成、cDNA のラベル化を行った後、マイクロアレイ解析を北海道システム・サイエンス株式会社に委託して行った。

4. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

C-CPE 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 681 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE184 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

5. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

Ib421-664 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 377 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれていた。そこで、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝

子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

6. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群

C-CPE、Ib421-664 の処理で 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 193 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

7. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

C-CPE 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 422 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE184 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。

8. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

Ib421-664 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 512 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものなどが含まれていた。そこで、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。C.

9. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が増加した遺伝子群

C-CPE、Ib421-664 処理で 12 時間後に 2 倍以上

遺伝子発現が増加した遺伝子は 83 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。

1 0. Real-time PCR による解析

平成 26 年度までのアレイ解析によって絞り込まれたマーカー候補遺伝子について Real-time PCR による解析を行った。12well Transwell plate に EpH-4 細胞を 1.18×10^5 cells/well で播種し、TER が安定するまで培養した。TER の安定後 C-CPE、Ib421-664 をそれぞれ投与し、0hr, 12hr, 24hr 後に TJ バリア機能の低下を確認後、それぞれの時間に細胞を回収し、「セパゾールを用いた Total RNA の抽出方法」によって Total RNA の抽出を行った。その後抽出した Total RNA を用いて cDNA を作製した (Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を利用)。Real-time PCR 解析の試薬として、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を使用した。そして解析装置として Life Technologies; StepOnePlus™ Real-Time PCR System を用いた。

1 1. SREBP2 の関与に関する検討

コレステロール生合成系の遺伝子群を制御することが報告されている SREBP2 に着目し、ノックダウン解析を行った。siRNA SREBP2 は、Dharmacon 社よりデザイン済み siRNA の SMARTpool を購入した。トランスフェクション試薬には、Lipofectamine® RNAiMAX Reagent を使用した。6well plate に 2×10^5 cells/well で EpH4 細胞を播種し、24 時間後に siRNA SREBP2 を添加し 72 時間培養後 RNA 抽出し Real-time PCR 解析を行った。膜電気抵抗値

(Transepithelial electric resistance : TEER) を測定する場合は 33 時間培養後、Transwell に播種し解析を行った。

1 2. ナノマテリアルの上皮バリア機能に与える影響

EpH-4 細胞を 12well Transwell plate に播種し、TEER が安定した後、ナノシリカ、ナノ銀を種々の濃度で添加した。以降 6 時間おきに TEER の測定を行った。ナノシリカ (sicaster®, フナコシ) は粒子径 10、50、300nm のものを使用した。ナノ銀 (nano Composix 社) は粒子径 10nm で表面をクエン酸修飾したのものを使用した。いずれも使用直前に粒子分散液を 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。

1 3. ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現変動

EpH-4 細胞を 12well Transwell plate に播種しナノシリカを種々の濃度で添加した。24 時間後に RNA を抽出、cDNA 作成後 Real-time PCR 解析を行った。またナノシリカの細胞障害性に関して LDH assay で評価を行った。96well plate に 3×10^4 cells/well で EpH4 細胞を播種し、ナノ物質を種々の濃度で添加した。24 時間後、培養上清を回収し定量を行った。Positive control として 0.2% Tween-20 処理群、Negative control はナノ物質無添加群とした。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. TJ binder の評価

bTJ binder である C-CPE と tTJ binder である Ib421-664 について TEER を低下させる効果があるか否かを検討した。Transwell で単層培養した EpH4 細胞に C-CPE184 (5 µg/mL)、Ib421-664 (50 µg/mL) それぞれ添加し、1 2 時間後、2 4 時間後に TEER を測定した (図 1)。その結果、それぞれの TJ binder 添加により有意

に TEER 値が低下し、ネガティブコントロールとして用いた TJ のシール機能をつかさどる claudin-4 との結合能が著しく低い変異体 C-CPE_{Y/L} は TEER 値を低下させなかった。したがって C-CPE184、Ib421-664 共に TJ を開口する薬物として使用できることが確認された。12 時間後、24 時間後に TEER 値が低下した細胞を回収し、抽出した RNA から cDNA を作製しマイクロアレイ解析に供した。

2. 発現量が低下した遺伝子の抽出

マイクロアレイ解析で得られたシグナル値を基にデータマイニングを行い、遺伝子の絞り込みを行った。まず、薬剤添加前と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子の抽出を試みた (図 2)。

C-CPE184 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 1067 個あったが、この中には Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した偽陽性の遺伝子が 267 個存在した。そこで、Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した 267 個の遺伝子を除く 800 個の遺伝子を抽出した。

同様に Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 763 個あり、その中に存在した Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した 338 個の遺伝子を除く 425 個の遺伝子を抽出した。

上記の方法で抽出した遺伝子には、C-CPE184 処理と Ib421-664 処理の両方で遺伝子発現が変動した遺伝子が含まれている。そこで、薬剤添加前の細胞と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで、単独または共通して 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子の抽出を試みた。

図 2 (C) のように C-CPE184 処理でのみ 2 倍

以上遺伝子発現が減少した遺伝子は、Ib421-664 処理で 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子を差し引いた 681 個であった。また、Ib421-664 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は、C-CPE184 処理で 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子を差し引いた 377 個であった。なお、C-CPE184 と Ib421-664 処理の両方で共通して 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 193 個であった。

3. 発現量が上昇した遺伝子の抽出

続いて、薬剤添加前と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子の抽出を試みた (図 3)。

C-CPE184 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 588 個あったが、この中には Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が増加した偽陽性の遺伝子が 139 個存在した。そこで、Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が増加した 139 個の遺伝子を除く 449 個の遺伝子を抽出した。

同様に Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 678 個あり、その中に存在した Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が増加した 176 個の遺伝子を除く 502 個の遺伝子を抽出した。

上記の方法で抽出した遺伝子には、C-CPE184 処理と Ib421-664 処理の両方で遺伝子発現が変動した遺伝子が含まれている。そこで、薬剤添加前の細胞と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで、単独または共通して 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子の抽出を試みた。

図 3 (C) のように C-CPE184 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は、Ib421-664 処理で 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子を差

し引いた 422 個であった。また、Ib421-664 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は、C-CPE184 処理で 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子を差し引いた 512 個であった。なお、C-CPE184 と Ib421-664 処理の両方で共通して 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 83 個であった。

4. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果 Cluster3 に分類された 121 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 4)。Pathway 解析の結果、コレステロール生合成系の酵素が 8 個 (**Hmgcs1, Pmvk, Fdps, Fdft1, Sqle, Cyp51, Dc4mol, Nsdhl**) 含まれていた。細胞膜の合成に必須のコレステロールが長期にわたり低下することで上皮細胞のバリア機能が低下する可能性があり、マーカー遺伝子として有効かもしれない。また、水溶性有機物質の膜輸送を司る SLC family に属する遺伝子が 3 個 (**Slc1a5, Slc2a6, Slc36a4**) 含まれていた。1a5 は中性アミノ酸、2a6 はグルコースのトランスポーター、36a4 はプロトン/アミノ酸共輸送体として機能している。SLC family は 400 種類ほどの数多くのメンバーから構成され、TJ 開口との関連は現段階では不明である。またアドヘレンスジャンクションの機能を司るカドヘリン遺伝子 (**Pcdh7**) が含まれ、TJ 関連遺伝子発現低下との関連が示唆された。

5. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster2 に分

類された 82 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 5)。抽出された遺伝子の中に細胞接着を担うデスモソーム構成タンパク質遺伝子が 4 個

(**Dsg3, Krt42, Krt6B, Krt14**) 含まれていた。**Dsg3** はカドヘリン family に属するデスモグレインであり同種結合で細胞間結合を構成し、細胞内で中間系フィラメントと結合している。Krt は上皮系の中間フィラメントであるケラチンであり、t TJ を開口させる Ib421-664 処理によりデスモソームを構成するタンパク質遺伝子発現が低下することは興味深い。また b TJ を開口する C-CPE の場合と同様にコレステロール生合成系遺伝子、**Fdft1** の発現低下が見られた。

6. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果、Cluster 1 に分類された 25 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 6)。抽出された遺伝子の中にはコレステロール生合成系遺伝子 (**Idil**)、カドヘリン遺伝子 (**Pcdhgb1**) が含まれていた。C-CPE、Ib421-664 はそれぞれ bTJ, tTJ に結合し TJ を開口させる、すなわち作用点が異なる物質によって共通に発現変動する遺伝子はマーカーとして有用である可能性が高いと考えられる。未知遺伝子を除き既知の遺伝子は以下の 14 個である。**Rin1, Mst1r, Idi1, Calr3, Cyp3a13, Fgfbp1, Pcdhgb1, Arrdc4, Polr3h, Aacs, Mat2a, Timp3, Il33, Crct1**。

7. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster 2 に分類された

115 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 7)。Pathway 解析では特に特徴的な遺伝子は見つからず、関連性の高い代謝経路は見いだせていない。また遺伝子発現が減少した遺伝子群に見られた細胞接着関連の因子などは含まれていない。

8. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster3 に分類された 24 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 8)。C-CPE と同様に Pathway 解析では特に特徴的な遺伝子は見つからず、関連性の高い代謝経路は見いだせていない。また遺伝子発現が減少した遺伝子群に見られた細胞接着関連の因子などは含まれていない。

9. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster1,4 に分類された 21 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 9)。作用点が異なる物質によって共通に発現変動する遺伝子はマーカーとして有用である可能性が高いと考えられる。未知遺伝子を除き既知の遺伝子は以下の 11 個である。**Pla2g3, Abca1, Pikfyve, Duox2, Lyst, Sdccag3, Lce3b, Gbp1, Shank2, 4-Mar, Snx21。**

10. Real-time PCR による解析

昨年度の検討でマイクロアレイ解析により C-CPE、Ib 添加によりコレステロール生合成系遺伝子の発現が有意に低下することが示された。実際に Real-time PCR を行いコレステロール生合成系遺伝子群の発現が低下するかの検討を行っ

た (図 10)。その結果、Hmgcs1、Fdft1、Fdps、Sqle、Cyp51、Sc4mol、Nsdhl、Pmvk、Idi1 の発現が顕著に低下することが示された。その他、細胞接着に関わる Dsg3 (デスモグレイン)、GPCR に結合する Arrdc4 (アレスチン)、癌転移や浸潤を阻害する内在性ペプチダーゼ阻害物質 Timp3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3)、上皮細胞のエンドサイトーシスに参与する Rin1 (Ras and Rab interactor) などの発現低下が確認された。またマイクロアレイ解析において発現上昇が示されていた遺伝子群についても Real-time PCR 解析を行った。膜の裏打ちタンパク質結合体 アンキリン 遺伝子 Shank2 (SH3/ankyrin domain gene)、エンドソーム輸送に関わる分子ソーティングネクシン遺伝子 Snx21 (sorting nexin family member 21)、糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ遺伝子 Fut7 (fucosyltransferase7) の発現上昇が確認された。

11. SREBP2 の関与に関する検討

コレステロール生合成系遺伝子の発現低下がみられ、その程度がバリア機能低下と相関していたことからコレステロールと TJ バリア機能との関連性が示唆された。そこでコレステロール生合成系遺伝子を一括して制御することが報告されている SREBP2 に着目し、C-CPE 処理による影響を検討した。その結果、C-CPE 処理により SREBP2 の発現が低下することが明らかとなった (図 11)。次に SREBP2 のノックダウン実験を行った。siRNA SREBP2 処理により EpH4 細胞の SREBP2、Hmgcs1、Cyp51 の発現低下を確認した (図 12)。SREBP2 ノックダウン EpH4 細胞を Transwell に播種し、TEER を計測した。その結果、コントロールに比べ TEER の上昇が抑えられた (図 13)。コレステロールは、TJ の足場となる細胞膜上の特定ドメインの安定性に関わっていることから、SREBP2 ノックダウンにより、細胞膜上のコレステロールが不足することで TJ バリ

ア形成が不安定になり TEER の上昇の抑制につながったと考えられる。

ナノ物質添加で SREBP2 の発現が低下することが確認されれば安全性評価のマーカーとして使用できることが期待される。

12. ナノマテリアルの上皮バリア機能に与える影響

Eph4 細胞に 10nm ナノ銀を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理し、経時的に TEER を計測した結果、処理後 24 時間でいずれの濃度においても TEER の変動は確認されなかった (図 14)。ナノ銀に関しては使用濃度範囲ではバリア機能に影響は与えないものと思われた。ナノ銀は高価でありさらに高濃度での検討は実施していない。

Eph4 細胞に 10nm, 50nm, 300nm ナノシリカをそれぞれ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理し、TEER を計測した結果、処理後 12 時間後より 10nm ナノシリカ処理の細胞で TEER の低下が確認された (図 15)。したがってナノシリカはサイズ依存的にバリア機能を低下させることが示された。粒子径が小さいほど影響が大きいことは、以前、肝臓に対する毒性を検討した時の結果と同様であった。

13. ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現変動

Eph4 細胞に 10nm, 50nm, 300nm ナノシリカをそれぞれ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 24 時間処理後の cDNA を用い、Real-time PCR を行った。その結果を図 16 に示す。10nm ナノシリカ処理の細胞でマーカー候補遺伝子 (Timp3, Snx21, Hmgcs1, SREBP2, Dsg3, Arrdc4) の発現上昇が確認された。Snx21 は C-CPE 添加時発現上昇が見られた遺伝子でナノシリカによる影響と相関があった。しかしながら他の遺伝子は C-CPE 添加時に顕著に発現低下が見られたものであり、予想とは逆の結果であった。ナノシリカがバリア機能ではなく

細胞毒性をもたらした結果、遺伝子発現が変化した可能性を考え、LDH assay による細胞障害性試験を実施した。その結果、10nm ナノシリカ添加では用量依存的な細胞毒性が観察された (図 17)。C-CPE は細胞毒性のない濃度条件で行っている。したがってナノシリカの場合、細胞毒性がバリア機能の評価に影響を与え、C-CPE と異なる結果をもたらしたと考えられる。図 16 の結果では Timp3, Snx21, HMGCS1, DSG が顕著に増加していることから細胞毒性のマーカー遺伝子として使用できる可能性が期待される。

E. 結論

哺乳類の上皮細胞株 EpH4 を用いて形成した単層膜に bTJ binder である C-CPE184 と tTJ binder である Ib421-664 を添加したところ有意な TEER の低下が観察された。したがって本研究では TJ 開口モデルとして EpH4 細胞層に C-CPE184 と Ib421-664 を添加する系を用い、TJ 開口時に変化する遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。12 時間後に 2 倍以上低下する遺伝子数を調査したところ、C-CPE184 処理のみで 681 個、Ib421-664 処理のみで 377 個、共通して変動するもの 193 遺伝子が抽出された。12 時間後に 2 倍以上上昇する遺伝子数を調査したところ、C-CPE184 処理のみで 422 個、Ib421-664 処理のみで 512 個、共通して変動するもの 83 遺伝子が抽出された。

平成 26 年度はさらに 24 時間後も大きく変動する遺伝子をクラスター分けにより絞り込み、パスウェイ解析などによりマーカー遺伝子候補となるものを絞り込んだ。その結果、C-CPE、Ib421-664 添加双方で遺伝子発現が低下する 14 遺伝子、双方で遺伝子発現が上昇する 11 遺伝子が抽出された。また C-CPE 単独でコレステロール生合成系遺伝子の発現が一斉に低下することを見出した。

平成 27 年度はコレステロール生合成系の遺伝子発現を一括して制御する SREBP2 に着目し解

析したところ、C-CPE 処理により SREBP2 の発現が低下し、バリア機能も同時に低下することを見出した。次にナノ粒子を用いてバリア機能に与える影響を観察したところナノシリカがサイズ依存的にバリア機能を低下させることが明らかとなった。しかしながらナノシリカと C-CPE では抽出してきた遺伝子発現に与える影響が異なり、本研究期間内ではバリア機能に焦点をあてたナノ粒子の安全性評価マーカーの同定には至らなかった。今回、限られたナノ粒子を用いての検討であったことから今後、種々の粒子を用いて検討を続けることにより有効なマーカー遺伝子の同定につなげたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Isoda, K., Kondoh, M., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Imazawa, T., Nishimura, T., Ishida, I. Yagi, K.: Silica nanoparticle-induced toxicity in mouse lung and liver imaged by electron microscopy., *Fundam. Toxcol. Sci.*, 2:49-54, 2015.

【総説・その他】

該当なし

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 1 件】

1. 早石 知浩、渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木清仁：ウエルシュ菌イオタ毒素を用いた tricellular tight junction 制御法の開発, 第 60 回毒素シンポジウム、兵庫県、宍粟市, 2013 年 7 月.

【国内学会発表：合計 3 件】

1. 井口 大輔、早石 知浩、Sussne M. Krug、

Michael Fromm、渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～Tricellular tight junction 制御法の開発～日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月.

2. 関 昌孝、井口 大輔、早石 知浩、吉田 有裕美、渡利 彰浩、近藤昌夫、八木清仁：Tight junction binder による上皮バリア制御における遺伝子発現変動の解析.、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月.

3. 井口 大輔、早石 知浩、Susanne M. Krug、竹田 浩之、Michael Fromm、渡利 彰浩、澤崎 達也、八木 清仁、近藤 昌夫：Tricellular tight junction binder, angubindin-1, の創製とバリア制御活性解析.、第 31 回日本 DDS 学会学術集会.、東京、2015 年 7 月.

【国際学会発表】

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

近藤昌夫、渡利彰浩、早石知浩、井口大輔、関昌孝、吉田有裕美

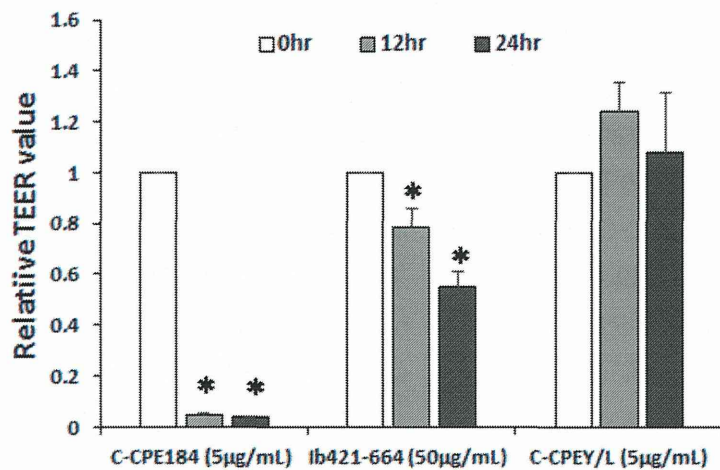


図1 TJ binderの膜電気抵抗値低下作用
TJ binder無添加の値を1.0とし相対値で示した。データは平均値±標準誤差 (n=3)。*p<0.05

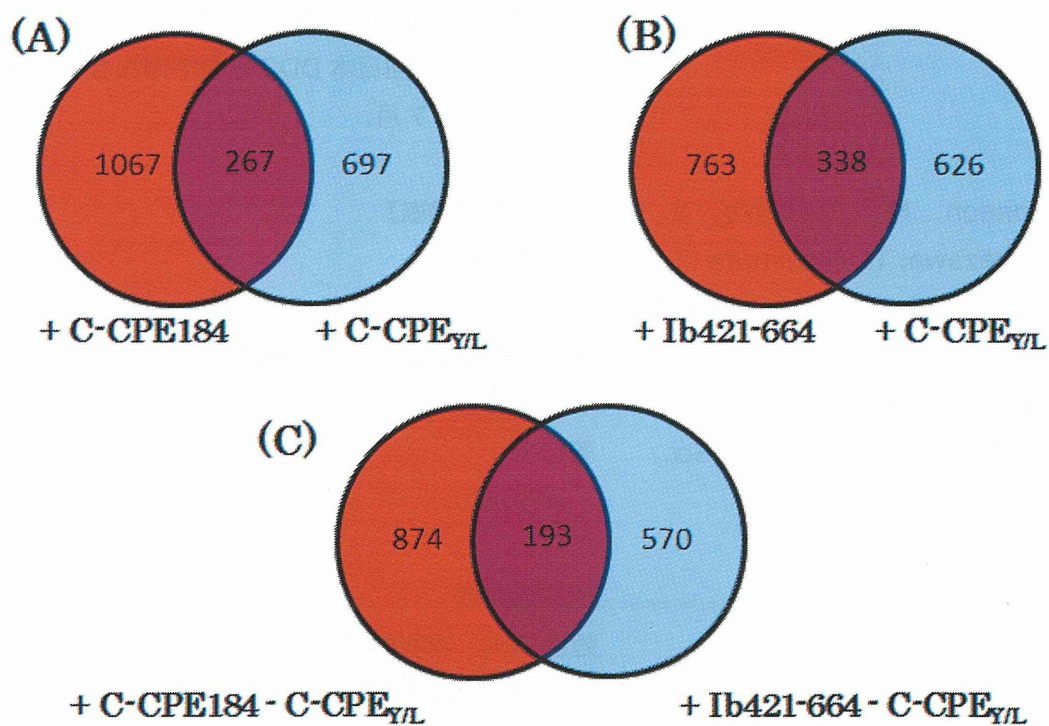


図2. 12時間後に発現が低下する遺伝子数.
(A) C-CPE184処理により低下する遺伝子
(B) Ib421-664処理により低下する遺伝子
(C) C-CPE184とIb421-664処理で低下する遺伝子の比較

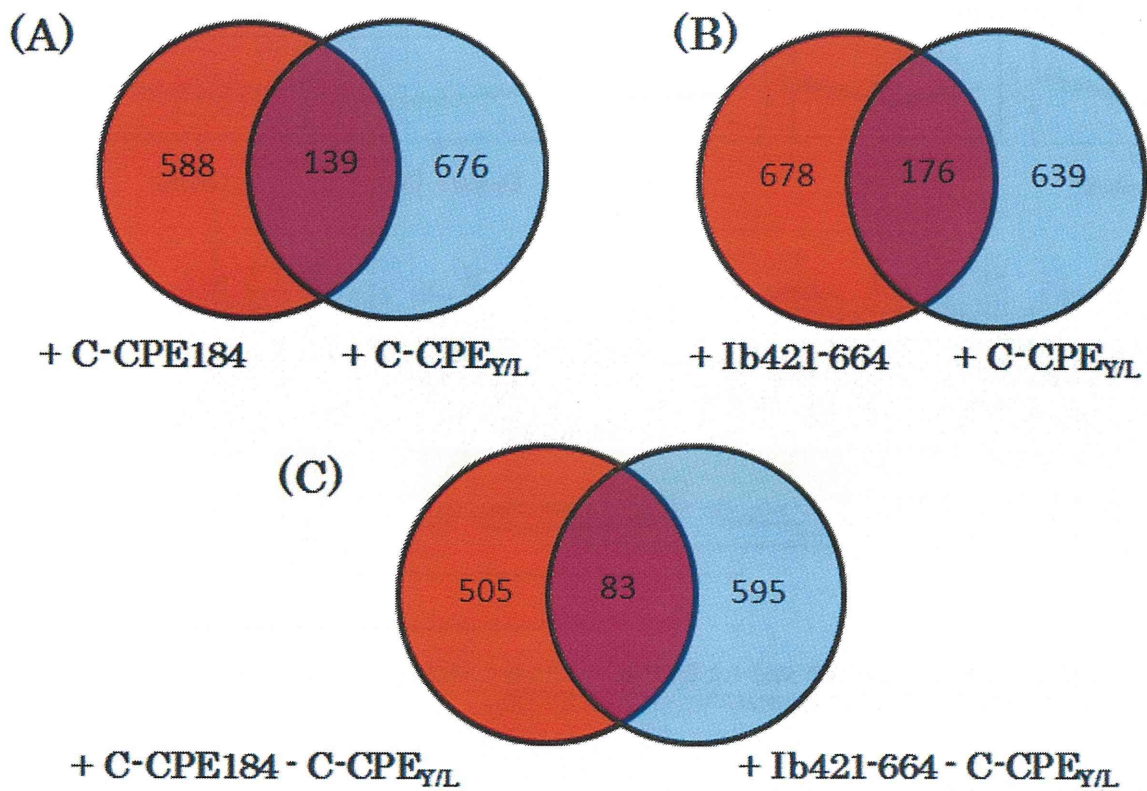


図3. 12時間後に発現が上昇する遺伝子数.
 (A) C-CPE184処理により上昇する遺伝子
 (B) Ib421-664処理により上昇する遺伝子
 (C) C-CPE184とIb421-664処理で上昇する遺伝子の比較

Total 681 genes

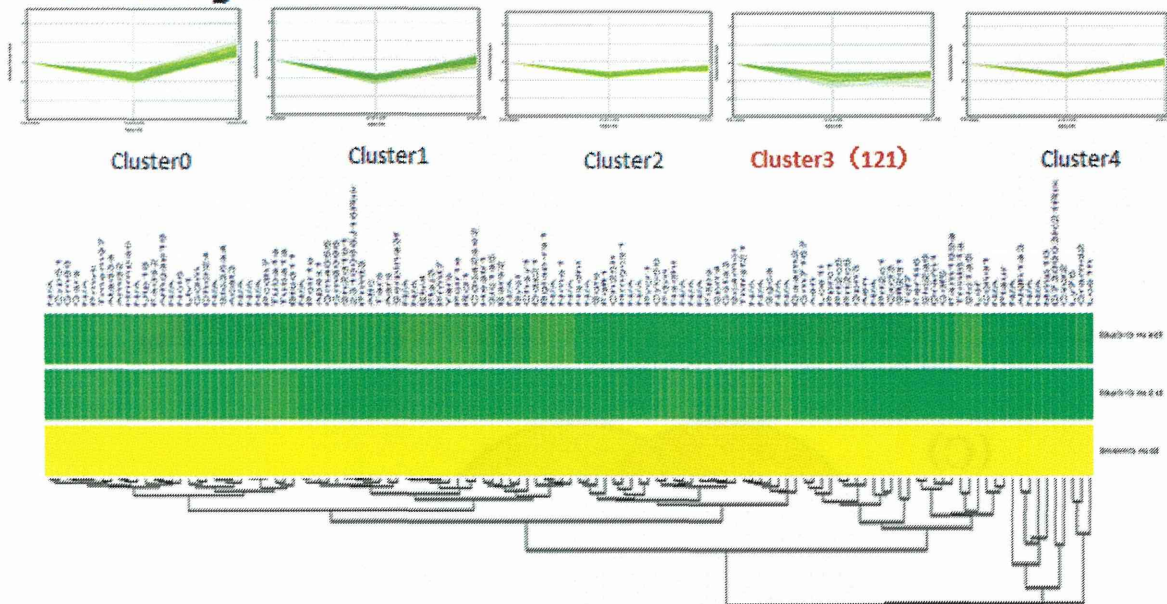


図4 C-CPE処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群. 12時間後に2倍以上低下した681遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster3のヒートマップを示した。

Total 377 genes

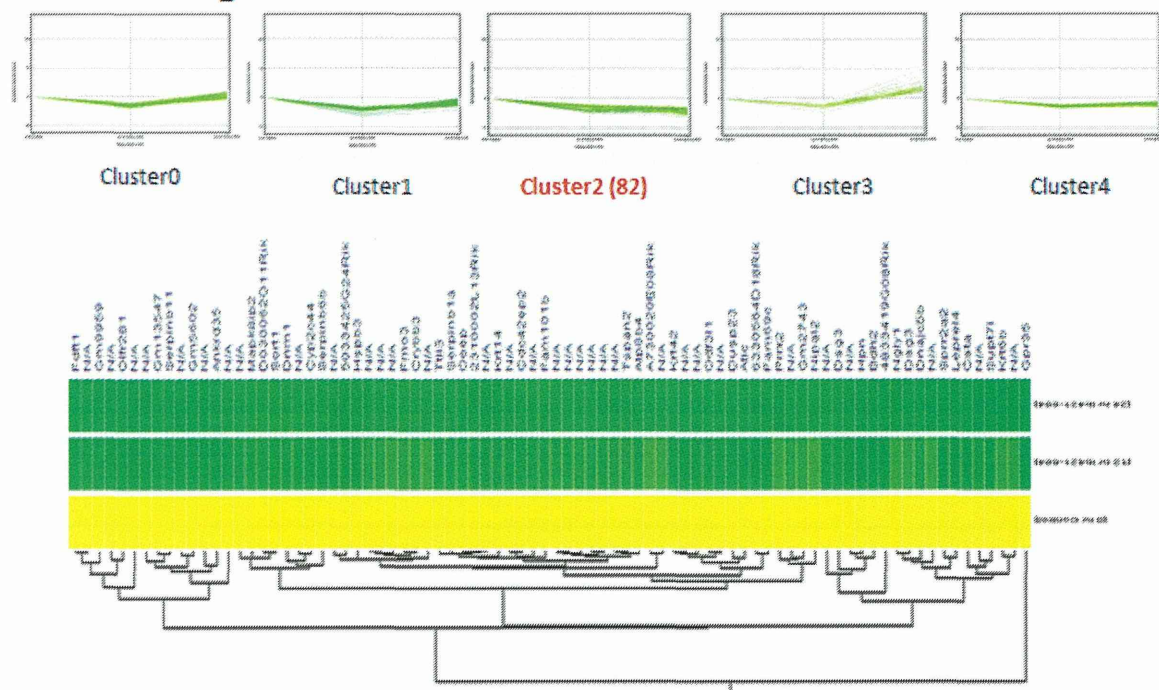


図5 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群. 12時間後に2倍以上低下した377遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster2のヒートマップを示した。

Total 193 genes

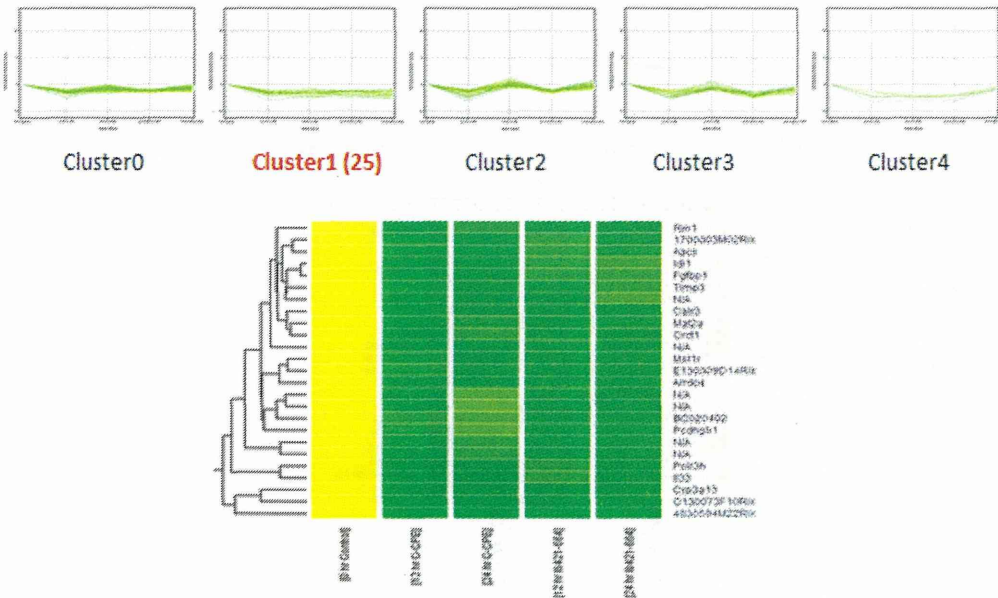


図6 C-CPE、Ib421-664処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した193遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster1のヒートマップを示した。

Total 422 genes

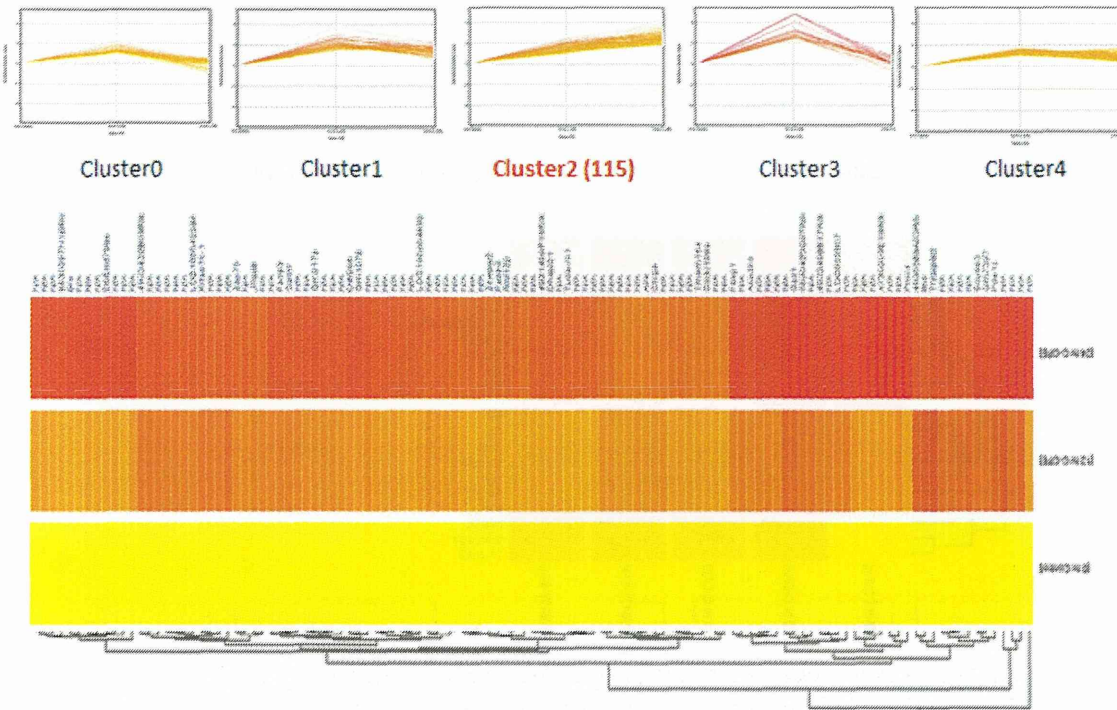


図7 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した422遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster2のヒートマップを示した。

Total 512 genes

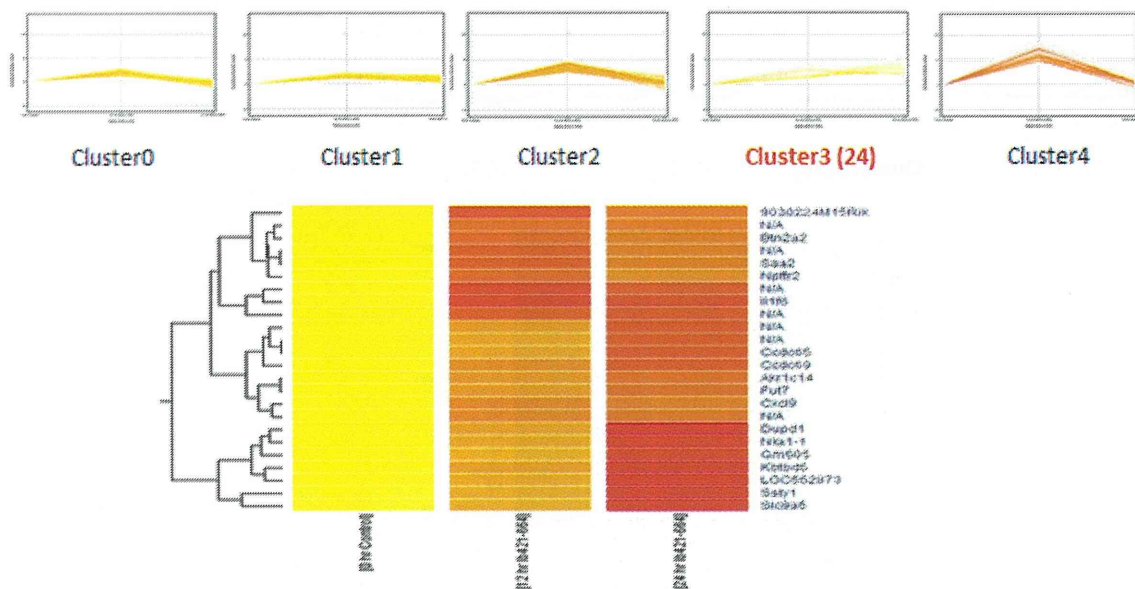


図8 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上上昇した377遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster3のヒートマップを示した。

Total 83 genes

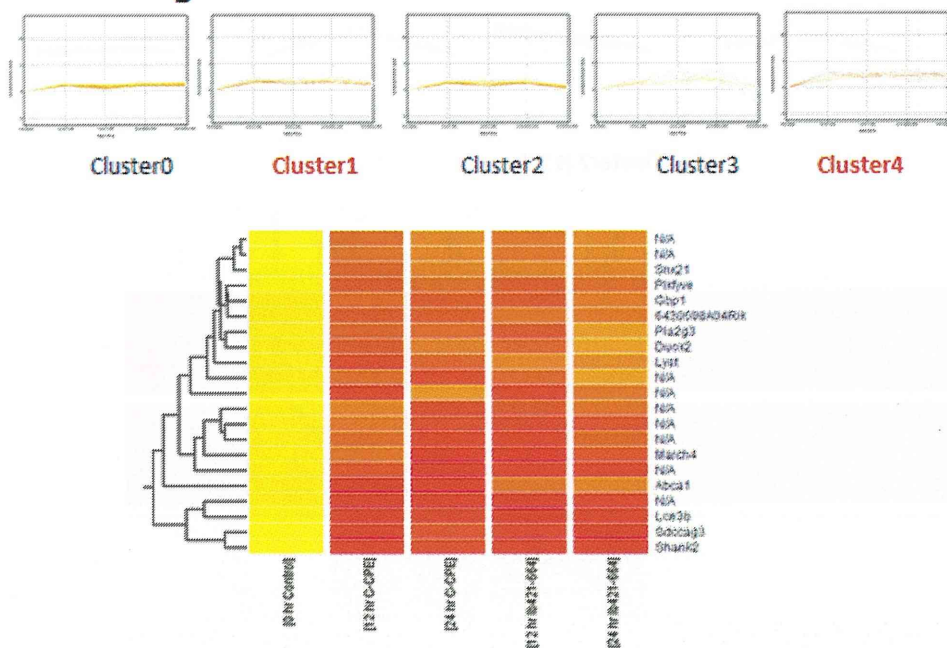


図9 C-CPE、Ib421-664処理群のうち、共通して遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上上昇した193遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster1、4のヒートマップを示した。

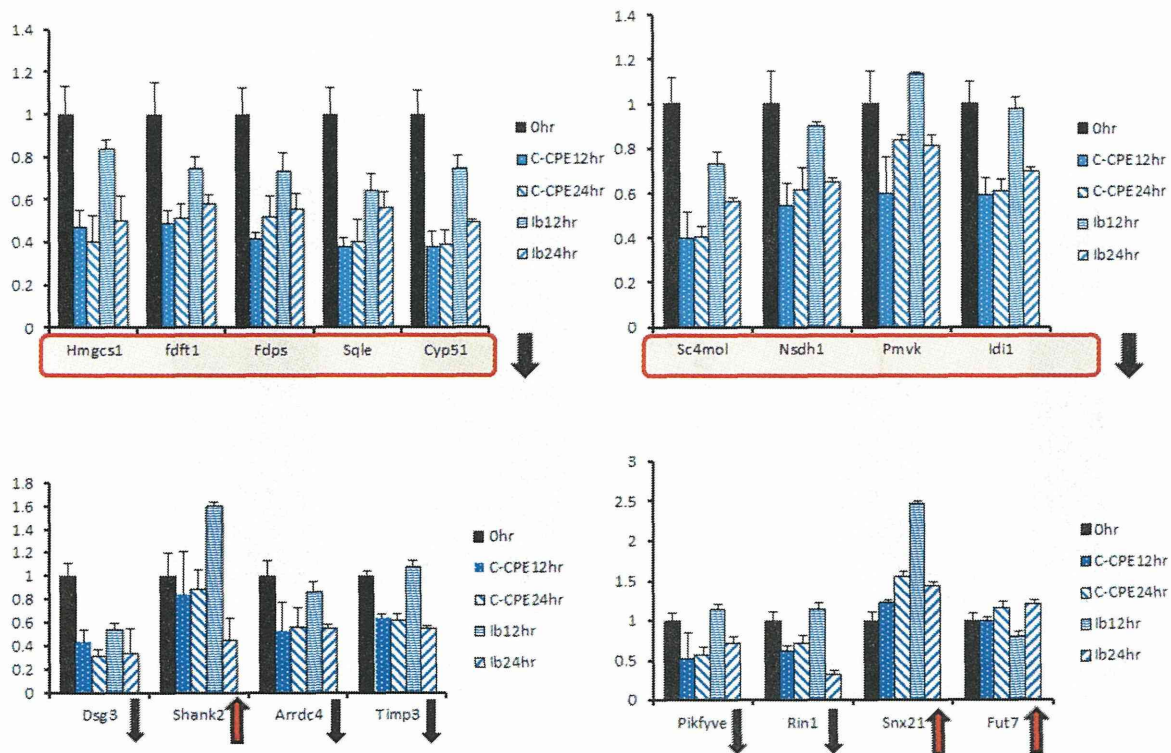


図10. Real-time PCR解析. 上段9遺伝子はコレステロール合成系の遺伝子発現を示す。矢印は下向きが発現低下、上向きが発現上昇した遺伝子を示す。

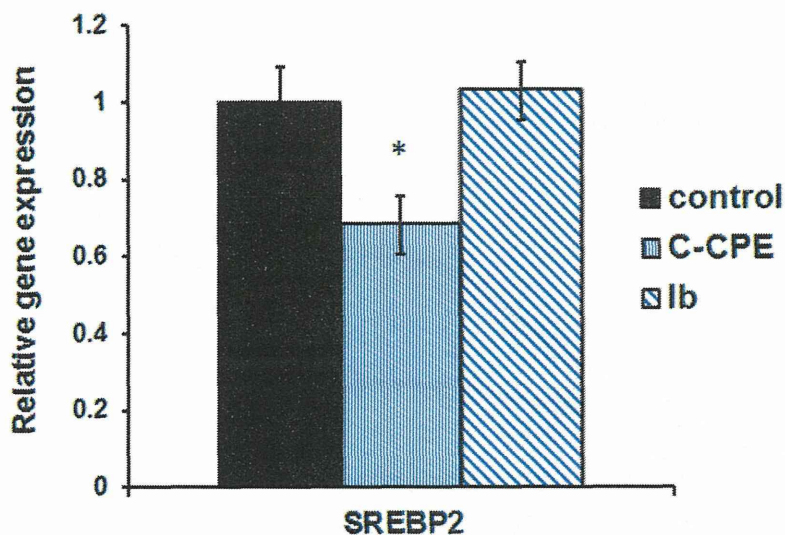


図11. TJBによるSREBP2の発現制御. Eph4細胞をC-CPEまたはlbで24時間処理後、Real-time PCR解析を行った。* $p < 0.05$ vs control.

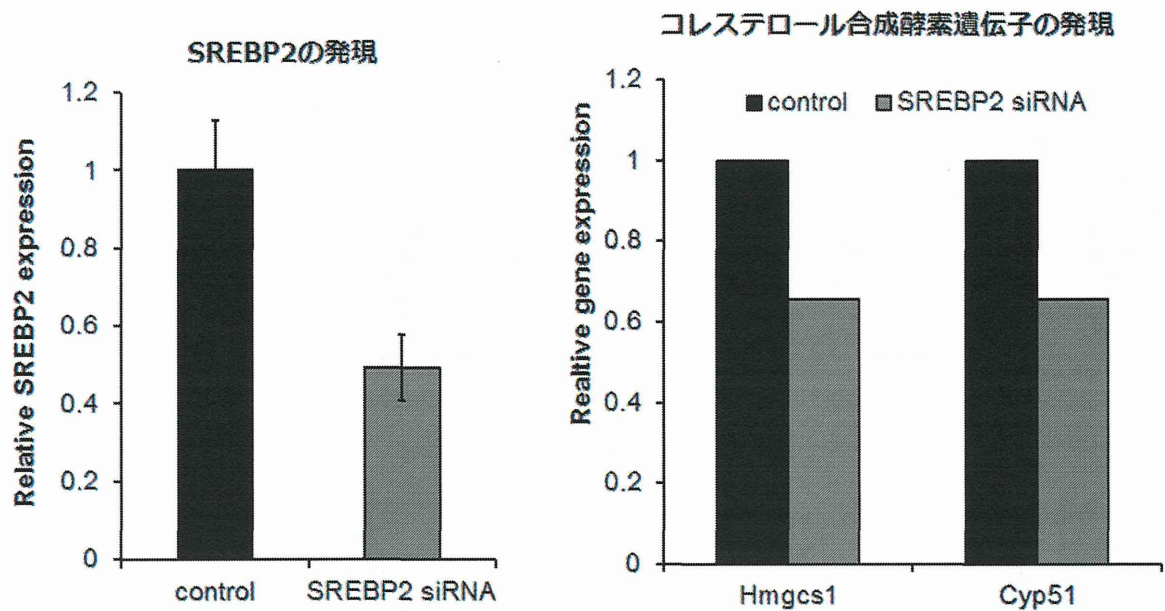


図12. SREBP2のノックダウン解析 Eph4細胞にSREBP2 siRNAを72時間処理しSREBP2、コレステロール生合成経路遺伝子 HMGCS1、Cyp51の遺伝子発現をReal-time PCRで解析した。

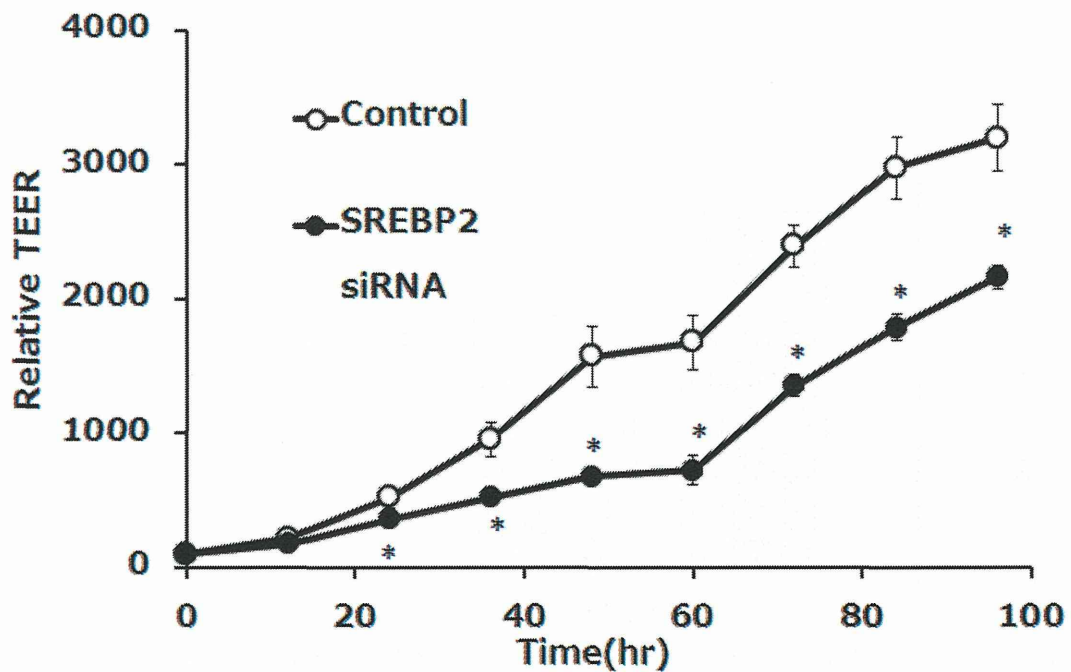


図13. SREBP2ノックダウンによるバリア機能低下. Eph4細胞にSREBP2 siRNA処理を33時間行い、細胞を Transwell播種後、膜電気抵抗値 (TEER)を測定した。* p < 0.05 vs control.

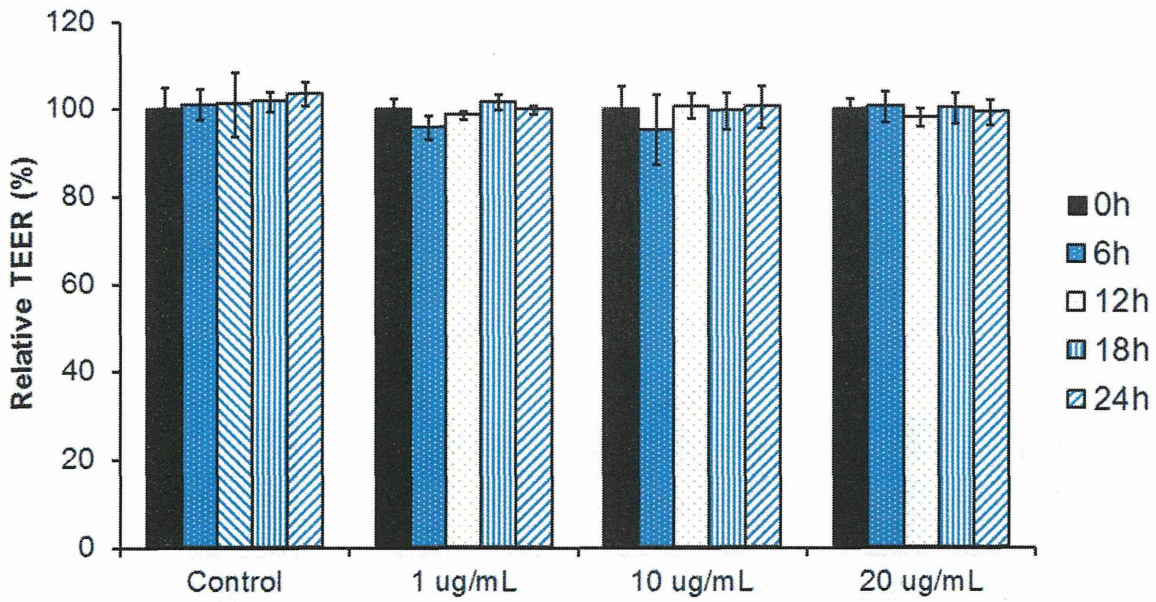


図14. ナノ銀の上皮バリア機能への影響. 粒子径10nmのナノ銀をEph4細胞に添加し、6時間おきにTEERを測定した。

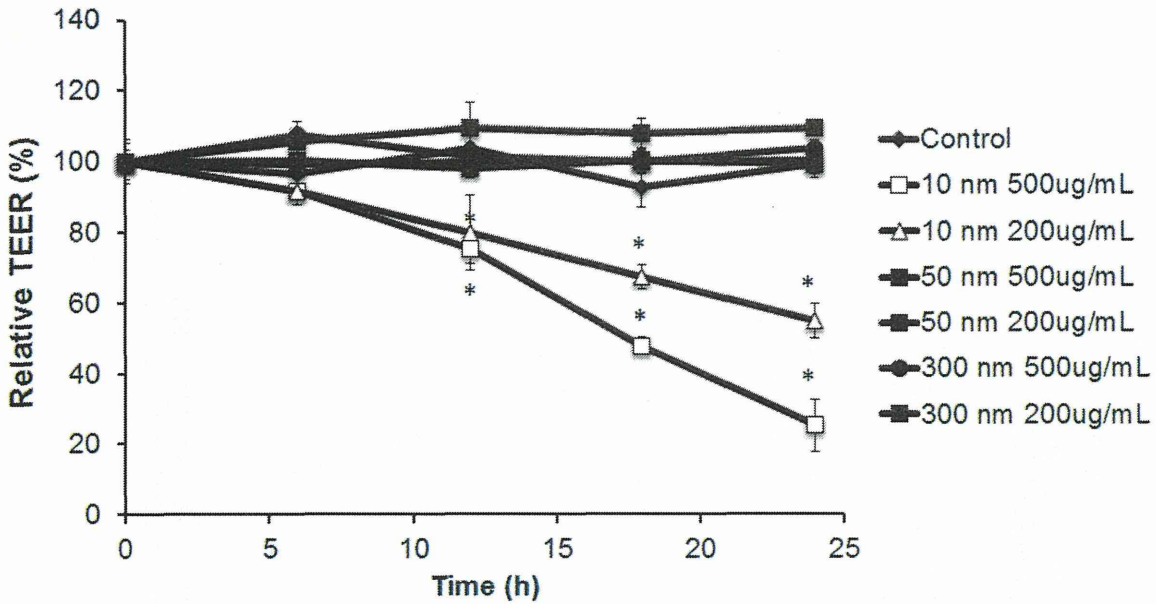


図15. ナノシリカの上皮バリア機能への影響. 粒子径10、50、300nmのナノシリカをEph4細胞に添加し、6時間おきにTEERを測定した。* $p < 0.05$ vs control.

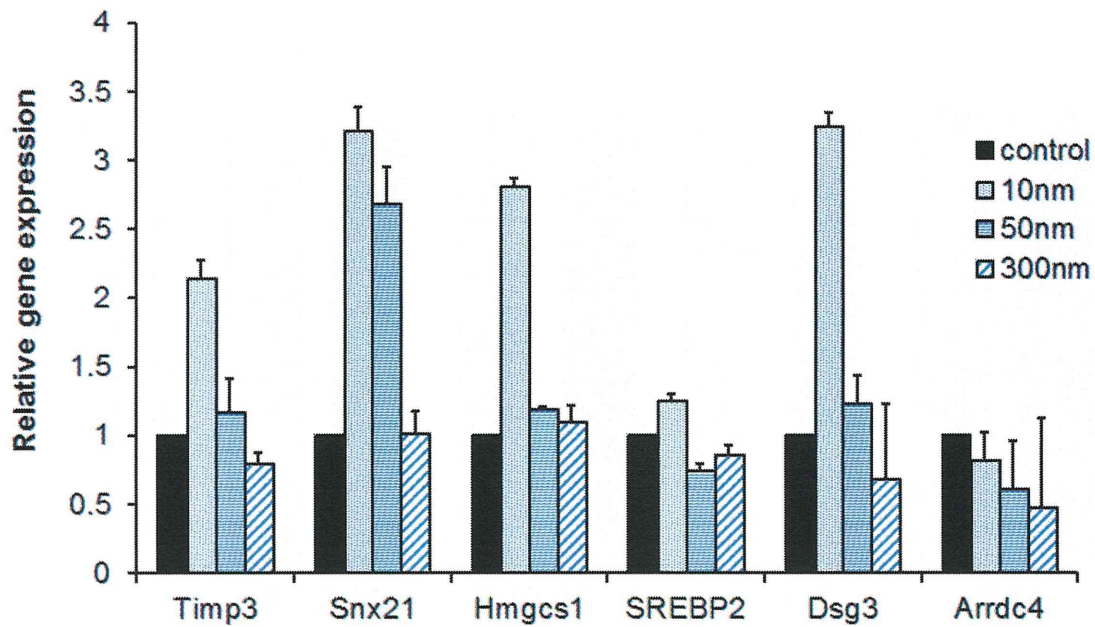


図16. ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現。Eph4細胞に粒子径10、50、300nmのナノシリカを500µg/mlの濃度で24時間処理し、Real-time PCR解析を行った。

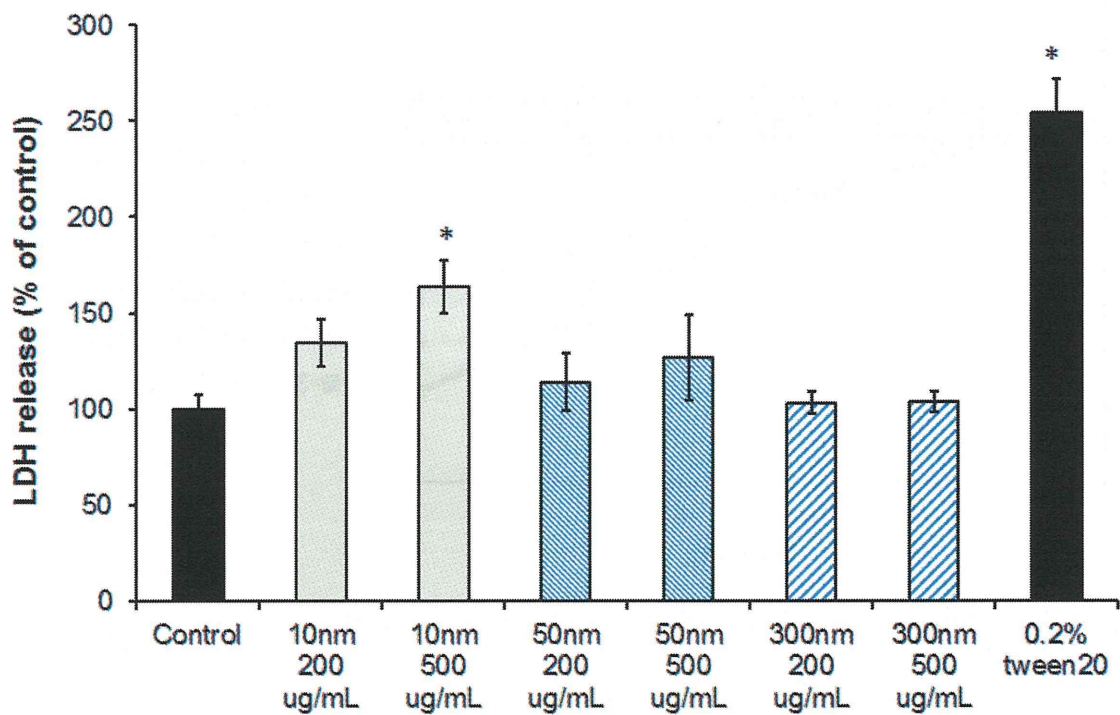


図17. ナノシリカ作用時の細胞障害性。Eph4細胞に粒子径10、50、300nmのナノシリカを作用させ、24時間後に培養上清中のLDH量を定量した。* p < 0.05 vs control.

雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの 情動行動に及ぼす影響に関する研究

研究分担者 松田 敏夫 国立大阪大学 大学院薬学研究科 薬物治療学分野 (平成 25~26 年度)
田熊 一徹 国立大阪大学 大学院歯学研究科 薬理学教室 (平成 27 年度)

研究要旨

近年、母親のみならず、父親の環境要因についても次世代に影響することが示唆されるようになった。そこで本研究は、化学物質として、最近急速に利用が増大しているナノマテリアルの 1 つである非晶質ナノシリカ (nSP) に着目し、父親への nSP 曝露が次世代の情動行動に及ぼす影響およびその分子基盤について検討した。雄性 BALB/c マウス (10 週齢) に、粒子径 30 nm の nSP (nSP30) を 1.25, 2.5 および 5 mg/kg の用量で 1 日おきに計 4 回、尾静脈内に投与した。投与開始から 35 日後に、無処置の雌性 BALB/c マウス (10 週齢) と交配させ、雄性の出生仔について解析を行った。9 週齢時に実施した一連の行動解析において、5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウス (以下 nSP30 仔マウス) における不安様行動の低下を認めた。すなわち、父親へのナノマテリアル曝露が次世代の情動行動に影響を及ぼすことが示唆された。一方、多動、攻撃性および記憶障害を誘起することが知られる隔離環境下で育成させた nSP30 仔マウスの異常行動の発現パターンは、対照群間と差異が認められず、情動行動異常発現と密接に関わるストレス感受性に対して父親へのナノマテリアル曝露が及ぼす影響は小さいものと考えられた。最後に、不安様行動の減弱に関わる分子機序の解明を目的として、脳視床下部/下垂体領域でのマイクロアレイ解析および遺伝子セットエンリッチ分析を行った。nSP30 仔マウスで発現変動していた遺伝子はホルモン活性に関係する因子群で高い関連性を認めた。また、半定量的 PCR により pituitary homeobox 1 (PITX1)、プロラクチン (PRL)、クロモグラニン A (CGA) および成長ホルモン (GH) の mRNA レベルが、nSP30 群の視床下部・下垂体で増大していることを確認した。以上より、nSP30 仔マウスでは不安様行動が減弱しており、本情動行動変化の発現に視床下部・下垂体における下垂体ホルモン PRL、CGA、GH およびその上流遺伝子である転写活性因子 PITX1 の遺伝子発現が亢進する可能性が考えられた。

A. 研究目的

近年の疫学研究により、化学物質曝露などの環境要因の効果が世代間を超えてもたらされることが示され、これまでに、母親の環境要因が次世代に及ぼす影響、特に妊娠期母体の内的・外的環境要因が次世代に及ぼす影響に関する研究が数多くなされてきた。一方で近年、母親のみならず、

父親の環境要因についても次世代に影響することが示唆されるようになった。そこで本研究は、化学物質として、最近急速に利用が増大しているナノマテリアルの 1 つである非晶質ナノシリカ (nSP) に着目し、父親への nSP 曝露が次世代の情動行動に及ぼす情動行動に及ぼす影響およびその分子基盤について検討した。

B. 研究方法

1. 父親動物へのナノマテリアル曝露と次世代動物の作製

雄性 BALB/c マウス (10 週齢) に、粒子径 30 nm の nSP (nSP30) を 1.25, 2.5 および 5 mg/kg の用量で 1 日おきに計 4 回、尾静脈内に投与した。投与開始から 35 日後に、無処置の雌性 BALB/c マウス (10 週齢) と交配させた。自然分娩により出生した仔を 3 週齢時に離乳し、9 週齢時より雄性マウスの行動学および神経生化学的解析を行った。

2. 隔離飼育ストレスの負荷

離乳時に雄性の各投与群をランダムに二分し、集団飼育群と隔離飼育群とした。前者は透明ケージにて 5~6 匹で、後者は不透明ケージにて 1 匹で飼育した。隔離飼育 6 週間後に行動解析を行った。

3. 自発運動の評価

自発運動の評価は、オープンフィールド試験 (Kataoka et al., 2013) により行った。新奇環境においたマウスの移動距離、立ち上がり回数、中央区画横断回数を Acti-Track System (Panlab, Barcelona, Spain) を用いて、90 分間測定した。

4. 不安様行動の評価

不安様行動の評価は、高架式十字迷路試験 (Kataoka et al., 2013) により行った。マウスを装置中央に置き、5 分間の行動をビデオ録画した。オープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間および進入回数を計測した。また、総滞在時間におけるオープンアームへの滞在時間の割合を算出した。

5. 抑うつ様行動の評価

抑うつ様行動の評価は、尾懸垂試験 (Ago et al., 2008) により行った。マウスの尾を固定して装置内に吊り下げ、6 分間の不動時間を MicroAct for Tail-Suspension (version 1.03; Neuroscience, Japan) を用いて自動計測した。

6. 社会性行動の評価

不安様行動の評価は、社会性相互作用試験 (Kataoka et al., 2013) により行った。被検マウスを測定ケージに 60 分馴化後、初遭遇となる同性同系統の侵入マウスを入れ、20 分間の行動をビデオ録画した。被検マウスが侵入マウスに対して示した嗅覚行動、毛づくろい行動ならびに攻撃行動の総時間を計測した。

7. 短期作業記憶の評価

短期作業記憶の評価は、Y 字迷路試験 (Sarnyai et al., 2000) により行った。マウスを装置中央に置き、8 分間の行動をビデオ録画した。各アームへの進入回数を計測し、3 回連続して異なるアームへ進入した回数を自発的交替行動数として求めた。これら計測値より、自発的交替行動変化率を次式「自発的交替行動変化率 = 自発的交替行動数 / (総進入回数 - 2) × 100」より算出した。

8. 文脈的空間記憶能の評価

文脈的空間記憶能の評価は、恐怖条件付け文脈学習試験 (Takuma et al., 2012) により行った。マウスを装置内に置き、音および電気刺激を与えない状況下で 125 秒間自由に行動させた。15 秒間の音刺激 (2800 Hz, 80 dB) とその最後の 5 秒間に電気刺激 (0.8 mA) を加える組み合わせ刺激を 1 セットとし、15 秒間隔で 6 回繰り返し、条件付けを行った。文脈依存試験では、条件付け 24 時間後に再び装置内にマウスを入れ、音および電気刺激を与えない状況下で 3 分間自由に行動させた。装置内でのマウスの行動をビデオ録画し、条件付けにおいては各電気刺激後 15 秒間に観察されたすくみ行動時間の百分率 (%) を、文脈依存試験においては 3 分間に観察されたすくみ行動時間の百分率 (%) をそれぞれ算出した。文脈依存試験で観察されたすくみ行動率 (%) を学習記憶の指標として評価した。

9. 脳組織由来 cDNA の調製

9 週齢時の雄性マウスより摘出した全脳より視床および下垂体領域を分画し、cDNA 標品を調製した。

10. マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の

解析

調製した視床および下垂体由来cDNAを用いて、マイクロアレイ解析を行った。有意水準を $P < 0.05$ として2群比較を行い、対照群と比べて2倍以上の発現上昇あるいは0.5倍以下の発現減少を示す遺伝子を抽出した。また、発現変動が認められた遺伝子群について、遺伝子セットエンリッチ分析(GSEA)を行った。

11. mRNA発現量変化の解析

マイクロアレイ解析およびGSEAにより選択した分子を標的としてPCRを行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離後、 β -actinを対象とするデンシトメトリー解析により定量した。

C. 研究結果 (次項Dにまとめて記載する)

D. 考察

1. 自発運動の評価

オープンフィールド試験における10分ごとの移動距離ならびに90分間の総移動距離において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの群間に差異は認められなかった(図1)。したがって、父親へのnSP曝露は次世代の自発運動に影響を及ぼさないことが考えられた。

2. 不安様行動の評価

高架式十字迷路試験において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスのクローズドアームでの滞在時間割合に差異は認められなかったが、オープンアームでの滞在時間割合では5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスで増加傾向が見られた(図2)。また、オープンフィールド試験においても、2.5 mg/kg nSP30曝露父親由来の仔マウスの中央区画横断回数は、対照父親由来の仔マウスより多く(図に示さず)、不安が低下している可能性が考えられた。これらのことより、父親へのnSP曝露が次世代の不安様行動に及ぼす影響が考えられ、その結論を導くには、さらな

る検討を要すると思われた。

3. 抑うつ様行動の評価

尾懸垂試験において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの不動時間に差異は認められなかった(図3)。したがって、父親へのnSP曝露は次世代の抑うつ様行動に影響を及ぼさないことが考えられた。

4. 社会性行動の評価

社会性相互試験において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの嗅覚行動の回数および総時間に差異は認められなかった(図4)。したがって、父親へのnSP曝露は次世代の社会性行動に影響を及ぼさないことが考えられた。

5. 短期作業記憶の評価

Y字迷路試験において、2.5 mg/kg nSP30曝露父親由来の仔マウスの自発的交替行動変化率が、対照父親由来の仔マウスより有意に小さいことを認めた(図5)。すなわち、父親へのnSP曝露が次世代の短期作業記憶能を低下させることが示唆された。

6. 文脈的空間記憶能の評価

恐怖条件付け文脈学習試験において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの条件付け時のすくみ行動の変化、ならびに文脈依存試験でのすくみ行動時間に差異は認められなかった(図6)。したがって、父親へのnSP曝露は次世代の文脈的空間記憶能に影響を及ぼさないことが考えられた。

7. 短期作業記憶および不安様行動の精査

一連の行動解析スクリーニングで変化が認められた短期作業記憶および不安様行動について精査を行った(図7)。Y字迷路試験において、1.25、2.5および5 mg/kg nSP30曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの群間で自発的交替行動変化率の差異は認められなかった(図7A)。すなわち、父親へのnSP曝露が次世代の短期作業記憶能を低下させるという図5A

の成績については再現性が得られなかった。高架式十字迷路試験において、5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスのオープンアームの滞在時間割合が、対照父親由来の仔マウスより有意に大きいことを認めた (図 7B)。すなわち、父親への nSP 曝露が次世代の不安様行動を低下させることが示唆された。

8. 自発運動に対する長期隔離飼育の影響

オープンフィールド試験における 90 分間の総移動距離において、隔離飼育による多動が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響は認められなかった (図 8)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代マウスにおいて長期隔離飼育による多動発現に影響を及ぼさないことが考えられた。

9. 社会性行動に対する長期隔離飼育の影響

社会性相互試験において、隔離飼育による攻撃行動を含む接触時間の増大が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響は認められなかった (図 9)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代マウスにおいて長期隔離飼育による社会性行動変化に影響を及ぼさないことが考えられた。

10. 短期作業記憶に対する長期隔離飼育の影響

Y 字迷路試験において、隔離飼育による変化は認められず (0 mg/kg 群)、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響も認められなかった (図 10)。すなわち、父親への nSP 曝露は次世代の短期作業記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された。

11. 文脈的空間記憶能に対する長期隔離飼育の影響

恐怖条件付け文脈学習試験において、隔離飼育による文脈依存試験でのすくみ行動時間の短縮が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による統計学的に有意な影響は認められなかった (図 11)。

しかしながら、5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスでは、隔離飼育によるすくみ行動時間短縮の改善傾向が見られており、父親への nSP 曝露が次世代の学習・記憶に及ぼす影響についての結論を導くには、さらなる検討を要すると思われる。

12. 不安様行動に対する長期隔離飼育の影響

高架式十字迷路試験において、隔離飼育による変化は認められなかった (0 mg/kg 群) (図 12)。一方、5 mg/kg nSP30 を曝露した父親由来の仔マウスで認められた不安様行動の低下 (図 12A) は、隔離飼育群では認められなかった (図 12B)。すなわち、父親への nSP 曝露が次世代の不安様行動に関わる分子基盤に影響を持つことが示唆される。

13. マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の解析

nSP30 群の視床下部/下垂体では対照群と比べて、732 個の遺伝子発現レベルが 2 倍以上となっていること、690 個の遺伝子発現レベルが 0.5 倍以下となっていることを認めた。また、本結果の遺伝子セットエンリッチ分析により、ホルモン活性に関係する因子群で高い関連性を認めた (図 13)。

14. mRNA 発現量変化の解析

ホルモン活性に関係する因子のうち発現増加の程度が高かった pituitary homeobox 1 (PITX1)、プロラクチン (PRL)、クロモグランイン A (CGA) および成長ホルモン (GH) について半定量的 PCR を行った (図 14)。nSP30 群の視床下部・下垂体では、対照群と比べて PITX1 mRNA が約 16.6 倍、PRL mRNA が約 30.7 倍、CGA mRNA が約 19.1 倍および GH mRNA が約 10.1 倍のレベルで発現上昇していることを認めた。すなわち、nSP30 の雄親曝露により、仔の視床下部・下垂体における下垂体ホルモン PRL、CGA、GH およびその上流遺伝子である転写活性因子 PITX1 の遺伝子発現が亢進する可能性が示され、これら分子と不安行動発現との関連性が考えられた。