

ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきと言える。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的であるうえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤透過性、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が必須となる。そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1) 胎盤動態、(2) 胎盤ハザード、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、それら情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを旨とする。

令和4年度研究では、①医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子のマウス胎盤形成期における影響、②ヒト妊娠性絨毛がん細胞株（BeWo）における、銀ナノ粒子曝露による合胞体化の抑制には、cAMP/PKAシグナルの変動や酸化ストレスの産生が関与し得ること、③製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカが、BeWoにおけるCGBの遺伝子発現量を減少し、forskolin誘導性の合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを示した。さらに、④トランスウエルにおける胎盤関門モデルにおいて、サイトトロホブラスト層と比較し、シンシチオトロホブラスト層で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。また、⑤先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸のBeWoに対する曝露が、hCGの遺伝子発現量の増加やHIF-1 Pathwayの阻害、細胞内へのグルコース取り込みの抑制を引き起こし得ることを明らかとした。以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、ナノマテリアルや化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初年次計画の予定通り達成できている。

また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、産学官・病院、ならびに、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している。本研究は、生殖発生毒性学的観点からの化学物質のリスク解析基盤を構築し、リスク管理に係る新たな政策形成に資する知見の提供に大きく貢献するのみならず、化審法における化学物質のリスク評価に資する毒性情報の創出やOECDテストガイドラインへの展開に資する知見の集積につながるものと期待される。

研究分担者
中島彰俊・富山大学・学術研究部医学系・教授

化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、催奇形性試験に代表されるように、母体よ

A. 研究目的

りも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきと言える。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的である。うえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤移行・蓄積、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が必須となる。

そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1)胎盤動態、(2)胎盤ハザード、(3)胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、それら情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを目指す。また、本研究で構築した試験法で得られた結果とガイドラインに基づいた標準的試験法との関係性を検証すると共に、胎盤毒性が疑われる化学物質による当該スキームの検証を図る。そのうえで、近年のナノテクノロジーの進展に伴い、化粧品や食品領域をはじめ、既に様々な産業分野の製品に実用化されているナノマテリアル(NM)などの毒性未知化学物質の胎盤毒性情報の収集を試みる。さらに、近未来的な出口として、OECDテストガイドラインや行政活用などを念頭に、協同する業界団体・学協会と連携し、本研究を実施することで、既存法の無い「統合的胎盤毒性評価スキーム」を新たに提案しようとするものである。

B. 研究方法

1. 被験化学物質

銀ナノ粒子は、nano Composix 社(San Diego, CA)より購入し、表面をクエン酸修飾した、粒子径が10 nm (nAg10、濃度1.0 mg/mL)のものを使用した。なお、以後の検討で銀ナノ粒子分散液を培地で希釈する際には、凝集を防ぐため、コーティングを行った後に実験に供した。具体的には、原液の銀ナノ粒子と20 mg/mLウシ血清アルブミン(BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

を等量ずつ混合し、1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に、銀ナノ粒子分散液を培地で各濃度に希釈した。非晶質ナノシリカは、Micromod Partikeltechnologie 社(Germany)より購入した。非晶質ナノシリカは、一次粒子径が10 nm (nSP10、濃度:25 mg/mL)のものを使用した。非晶質ナノシリカについては、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE)による5分間の超音波処理を実施した。バルブロ酸(VPA)はWako(Osaka, Japan)より購入した。VPAはPBSに溶解させ実験に供した。

2. 細胞培養および合胞体化誘導

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるBeWoは、JCRB細胞バンク(Japanese Collection of Research Bioresources; Osaka, Japan; JCRB9111)より購入した。BeWoの維持には、56°Cで30分間の非働化処理を行った10%ウシ胎児血清(FBS; lot: 015BS427; Biological Industry; Beit Haemek, Israel)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液(Wako)を含むHam's F-12(Wako)を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへの合胞体への影響については、Ham's F-12で終濃度50 μMに調製したforskolin(Cayman chemical, Ann Arbor, MI)溶液をBeWoに添加し48時間培養した。ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるJEG-3は、ATCC(HTB-36)より購入した。JEG-3の維持には、56°Cで30分間の非働化処理を行った10% FBS(Biological Industry)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液(Wako)を含むDMEM(Wako)を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。

3. 妊娠マウスへのnAg10単回投与の影響評価

雌性のBALB/c交配日確認マウスは、日本SLC(Shizuoka, Japan)より購入し実験に供した。マウスは、25 ± 2 °C、各12時間の明暗サイクル環境下で飼育し、飲料水とMF(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)を常時与えた。また、本研究における実験動物の飼育および実験は、大阪大学薬学研究科三号館動物室にて行い、大阪大学動物実験規程に準じた。妊娠10.5日目のBALB/cマウスに、グルコース溶液またはnAg10(0.078、0.31、1.25 mg/kg)を尾静脈

より単回投与し、妊娠 15.5 日目に解剖を行い、胎仔重量および胎盤重量を測定した。

4. ATP および cAMP 産生変動評価

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。続けて、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 を各濃度に調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。ATP 濃度は CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega, Wisconsin, UK) を用いて、cAMP 濃度は cAMP-Glo Assay (Promega) を用いて解析した。

5. 細胞内活性酸素種 (ROS) 産生評価

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。続けて、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 (0.156 μg/mL)、H₂O₂ (100 μM) および N-acetylcysteine (NAC, 5 mM) を調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。その後、BeWo 細胞の核を Hoechst で、細胞内の ROS を CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により染色し、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ800, Keyence) で撮影した。

6. Real-time RT-PCR による合胞体化関連遺伝子の発現量評価

6 well プレートに 1.5×10⁵ cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 および nAu10 を目的の濃度にそれぞれ希釈後、BeWo に添加し 48 時間培養した。前項と同様の方法でサンプルを調製し、CFX384 (BioRad) を用いて real-time RT-PCR を実施し、合胞体化関連遺伝子 (CGB, SDC1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

7. シンシチオトロホブラスト層の形成

ポアサイズ 0.4 μm、膜面積 0.3 cm² の Polyethylene terephthalate メンブレンを有するセルカルチャーインサートに 3.3×10⁴

cells/well で JEG-3 を播種し、48 時間毎に培地を交換しながら、8 日から 12 日間培養した。この間、24 時間から 48 時間毎に 8 日から 12 日間抵抗値を測定した。抵抗値の測定には、ミリセル ERS 装置 (Millipore, Billerica, MA) を用いた。同時に、細胞層の無い培養膜の抵抗値 (ブランク) も測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を積算して細胞層の TEER 値 (ohms × cm²) とした。TEER 値がプラトーに達した後、DMEM および Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM; Takara Bio, Shiga, Japan) に終濃度 50 μM に調整した forskolin 溶液を apical 側に処置し TEER 値を 24 時間毎に測定しながら 72 時間培養した。

8. 傍細胞経路を介した物質の透過性評価

JEG-3 に Forskolin および EGM を処置し 72 時間培養後、終濃度 5 μM の Sodium fluorescein (Na-flu; Wako)、fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (Sigma-Aldrich) を添加し、0、1、3、6、24 時間後にサンプリングした。サンプルは蛍光光度計 (M1000; Tecan, Switzerland) により、excitation 475 nm、emission 500-550 nm の条件で蛍光強度を定量し、細胞層を介した見かけの物質透過係数 (P: apparent permeability coefficient) を算出した。

9. Real-time RT-PCR による合胞体化関連遺伝子の mRNA 発現量評価

目的の細胞数で播種した BeWo 細胞懸濁液を、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへの合胞体化への影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、ナノ粒子を各濃度に調製後、BeWo に添加し 48 時間培養した。シンシチオトロホブラストにおけるホルモン産生への影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo に添加し 24 時間培養することでシンシチオトロホブラストへの融合を誘導した。その後、バルプロ酸 (VPA) を各濃度に調製後、BeWo に 72 時間添加した。FastGene RNA Basic Kit (FastGene; 日本ジェネティクス; Tokyo, Japan) のプロトコールに準じて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA) により cDNA に

逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、各種プライマー (Eurofins Genomics; Tokyo, Japan) とジーンエース SYBR qPCR ミックス α Low ROX (ニッポンジーン; Tokyo, Japan) により反応溶液を調製し、CFX384 (BioRad; Hercules, CA) を用いて real-time RT-PCR を実施した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin あるいは GAPDH 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

10. Western Blotting による関連タンパク質の発現量評価

VPA がシンシチオトロホプラストにおける HIF-1α と GLUT1 の発現におよぼす影響については、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo に添加し 24 時間培養することでシンシチオトロホプラストへの融合を誘導した。その後、各濃度に調製した VPA を BeWo に 72 時間添加した。タンパク質の回収は、細胞を PBS で洗浄し、RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM EDTA, Protease Phosphatase inhibitor (Thermo Fisher scientific, MA)) にて懸濁し、15 分氷上でインキュベートした後、16,000 x g, 4°C で 30 分間遠心した。上清を回収し、BCA assay (Thermo Fisher scientific) によりタンパク質量を標準化した後に、6xSDS sample buffer (0.375M Tris pH 6.8, 12% SDS, 60% glycerol, 0.6M DTT, 0.06% bromophenol blue) と混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) した。SDS-PAGE は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動後のゲルを immobilon-P Transfer membrane (PVDF 膜; MERCK MILLIPORE, Burlington, MA) にウェット式にて 1.5 時間転写し、5% Skim milk (Wako)/TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) を添加してブロッキングした。1 次抗体として Actin (Sigma-Aldrich)、ならびに、HIF-1α, GLUT1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 4°C で一晩反応させた。その後、2 次抗体として、HRP/anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)、HRP/anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を室温で 1 時間反応させた。TBST で洗浄後、PVDF 膜をイムノスター LD

(Wako) で処理し、発光像を LAS-4000 (FUJI Film) により撮影した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月に厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. nAg10 曝露が妊娠転帰におよぼす影響評価

本検討では、粒子径 10 nm の銀ナノ粒子 (nAg10) が胎盤形成や妊娠結果におよぼす影響を、妊娠マウスにより解析した (図 1A)。銀ナノ粒子の曝露経路としては、経肺 (吸入)、経皮、経口などが挙げられるが、我々のこれまでの取り組みを含め、いずれの経路からも吸収され全身分布し得ることが明らかとなっている。そこで本検討では、銀ナノ粒子のリスク解析に資するハザード同定を目的に、種々ルートからの吸収後の影響を直接的に評価するため、尾静脈内投与を選択した。まず、妊娠 10.5 日目での nAg10 投与により、顕著な母体体重変化は認められなかった (図 1B)。妊娠 15.5 日目に各マウスを解剖し、胎仔重量および胎盤重量を測定した。その結果、nAg10 投与群において胎仔重量に顕著な変動は認められなかったものの (図 1C)、胎盤重量は nAg10 (0.31 mg/kg mouse) 投与群において有意に低下した (図 1D)。従って、nAg10 が胎盤形成に対してハザードを呈することが示唆された。この点、nAg10 (1.25 mg/kg) 投与群では有意な変化は認められなかった。多胎動物の胎仔発育には胎仔数や胎盤への血流量などの要因が関与し、胎児数が減少すると胎児体重は増加することや、胎仔発育と胎盤重量は相関することが示唆されている。そのため、これら複合的な要因も相まって、nAg10 の投与量依存性が認められなかったものと考察している。今後、本結果について多角的な

視点から考察するうえで、胎盤や胎仔への nAg10 の移行量の解析や、複数回曝露による影響評価、さらには、胎盤形成・成熟について、病理解析や胎盤各層におけるマーカー分子の発現を評価することで、nAg10 が胎盤形成過程におよぼす影響を追究していくことが重要である。また、曝露実態を鑑み、経肺（吸入）、経皮、経口曝露後の胎盤形成や妊娠結果におよぼす影響についても検討していく予定である。

2. nAg10 曝露による合胞体化関連シグナル分子の変動解析

これまでに研究代表者らは、nAg10 が、forskolin により誘導される BeWo における合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを明らかとしてきた。胎盤形成期の合胞体化過程は、多数のシグナルから制御を受けることが報告されている。その中でも合胞体化促進に中心的に働く経路としては cAMP/PKA シグナルが最も一般的に知られており、実際のヒト胎盤形成過程では妊娠初期に産生増大する hCG がそのレセプターである LHCGR に結合後、アデニル酸シクラーゼの活性化を介して ATP を cAMP へと変換することで下流シグナルを活性化し合胞体化が進行する。そこで、nAg10 曝露による BeWo 細胞内での ATP 濃度の測定を試みると共に、ATP から変換され合胞体化に必須の因子である cAMP の細胞内濃度の測定を実施した。ATP 濃度は nAg10 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加により有意に低下することが示された (図 2A)。続けて、細胞内 cAMP 濃度の測定を実施したところ、forskolin 単独処置群において濃度上昇が示された一方で、nAg10 共処置時には添加濃度依存的な濃度上昇が示された (図 2B)。nAg10 による ATP 産生の低下が誘導されたことから、ATP の変換により産生される細胞内 cAMP 濃度も低下すると考えていたが、予想に反し cAMP 濃度の上昇が示された。本結果において、forskolin 単独群と比較した際の nAg10 処置による cAMP 濃度の上昇は、nAg10 が p38 MAPK 経路や mTOR 経路などの合胞体化関連経路に変動をおよぼし合胞体化を抑制した結果に対して、代償的に上昇している可能性が考えられる。

3. nAg10 曝露による合胞体化抑制における酸化ストレスの関与

nAg10 処置時に ATP 濃度の減少が認められたこと、細胞内における主要な活性酸素種 (ROS)

の産生場所が ATP 合成と同じミトコンドリアであることを踏まえ、forskolin と nAg10 を共処置した際の細胞内での ROS 産生を評価することとした。ROS 存在下で蛍光を発する試薬である CM-H₂DCFDA を用いて ROS 産生を評価したところ、forskolin-nAg10 共処置群において強い蛍光が観察された。このとき nAg10 とともに抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を処置した群では蛍光が観察されなかったことから、nAg10 による ROS 産生を示した (図 3)。

続けて、nAg10 による ROS 産生が合胞体化の進行におよぼす影響を評価するために、合胞体化マーカーである CGB ならびに合胞体化促進分子である *ERVFRD-1* の発現変動を RT-PCR により解析した。その結果、NAC 処置により nAg10 誘導性の合胞体化抑制が緩和される結果が得られた (図 4)。一方で NAC 5 mM を処置した群では、NAC による発現抑制の緩和は認められなかった。この点、NAC がミトコンドリアの酸化を誘導しシトクロム c の放出を促進することが報告されており、nAg10 と NAC の共処置によりミトコンドリア障害が増悪した可能性も考えられる。以上の結果を総合すると、nAg10 は合胞体化過程において ROS 産生を誘導することで、合胞体化の抑制に関与する可能性が示された。一方で今回観察した ROS が、nAg10 がミトコンドリアに変動を与えた結果として産生された ROS なのか、それとも別の経路で産生誘導された ROS がミトコンドリアに障害を与えたのかについては検討できていない。今後は、細胞内でのミトコンドリアへの移行性ならびにミトコンドリア ROS の産生について検討を進めることで、nAg10 による合胞体化抑制の機序解明を期待する。

4. nSP10 曝露が合胞体化関連遺伝子の発現に与える影響

本検討では、NM の胎盤毒性の理解に向けたハザード情報の収集と将来的な NM の安全性確保に資するハザード発現機序の解明を目的に、胎盤ホルモン産生に着目し NM の生体影響評価を試みた。NM のモデルとしては、製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカを実験に供した。はじめに、非晶質ナノシリカ曝露における胎盤ホルモン産生への影響を検討するため、未分化の BeWo に forskolin を処置し、その後、粒子径 10 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10) を 72 時間処置した際のヒト絨毛性ゴナドトロピン β

(hCG, gene name; *CGB*) の遺伝子発現量を real-time RT-PCR により解析した。なお、作用濃度に対して細胞障害性が認められないことを確認している (図 5A)。解析の結果、nSP10 曝露群において、対照群と比較し、*CGB* の発現量に有意な変動は認められなかった (図 5B)。一方で、未分化の BeWo に forskolin と nSP10 を共処置した際には、nSP10 の作用濃度に対する細胞障害性は認められず (図 5C)、また、*CGB* の mRNA の発現量は、forskolin 単独処置群と比較して、nAg10 50 µg/mL 共処置により有意に発現量が減少することが明らかとなった (図 5D)。

そこで、nSP10 が合胞体化におよぼす影響を評価するため、合胞体化の進行に伴い血管新生シグナルの伝達に関わる分子である Syndecan-1 (gene name; *SDC1*)、および、合胞体化の促進に関与する分子である Syncytin-2 (gene name; *ERVFRD*) の発現量を評価した。その結果、forskolin 添加群と比較して、nSP10 (50 µg/mL) 共処置群において、各 mRNA の発現が有意に抑制されることが示された (図 6)。以上の結果から、形態学的な解析等が必要であるものの、nSP10 が BeWo において、forskolin により誘導される合胞体栄養膜細胞の形成を抑制することが示唆された。今後は、nSP10 曝露により合胞体化の誘導が抑制される機序解明を進めると共に、合胞体栄養膜細胞の形成抑制が、動物レベルにおいても認められるかについて、並行して検討を進めることで、NM が胎盤形成・成熟過程におよぼす影響について理解を深めていく。

5. シンシチオトロホブラスト層に着目した胎盤透過性評価系の構築に向けた検討

我々は、日々様々な化学物質に曝露しており、胎児もまた、それら化学物質に曝露することで、先天性異常や胎児毒性等のリスクが懸念される。化学物質の胎児に対するリスクを把握するにあたって、母親が曝露した化学物質は胎盤を透過し、胎児へ移行することから、胎盤における動態情報が求められる。この点、胎盤関門は母体血と胎児血間で物質輸送を制御する器官であることから、化学物質のリスクを評価するうえで *in vitro* モデルの構築が求められている。胎盤関門はサイトトロホブラスト層 (CT 層) と、CT 層が合胞体化し形成されるシンシチオトロホブラスト層 (ST 層) の 2 層から構成されているが、汎用されている *in vitro* モデルでは CT 層のみのものが一般的であ

り ST 層を考慮したものは少ない。一方で、CT 層と ST 層では細胞間結合に関わる分子やトランスポーターの発現が異なることが知られていることから、両層の透過性は異なると考えられる。そこで本検討では、CT 層と ST 層の比較解析を通じて、ST 層の透過性の理解を深めることを目指す。

トランスウェルセルカルチャーインサートにヒト絨毛由来 JEG-3 を播種し、経時的に TEER 値を測定したところ、8 日目時点において TEER がプラトーに達したと判断し、forskolin および EGM を処置した。その後 72 時間培養した層において TEER は Nontreated (N.T.) 群、forskolin (Frk) 群、Frk+EGM 群の順に小さくなっていった (図 7A)。この時、合胞体化マーカーである *CGB* の発現を real-time RT-PCR で評価したところ、Frk 群において最も大きく上昇しており、合胞体化が亢進していることが示唆された (図 7B)。この時、Sodium fluorescein (Na-Flu ; 図 8A)、分子量 4 kDa の FITC-dextran (FD-4 ; 図 8B)、分子量 40 kDa の FITC-dextran (FD-40 ; 図 8C) の透過性を評価したところ、いずれにおいても N.T.群、Frk 群、Frk+EGM 群の順に大きくなることが示され、TEER の結果と合わせて考察すると、N.T.群、Frk 群、Frk+EGM 群の順で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。今後は、CT 層および ST 層におけるトランスポーターの発現量を解析すると共に、それらトランスポーターを介した化学物質の輸送能等について評価することで、CT 層と ST 層の比較を進める。

6. バルプロ酸が胎盤のホルモン産生におよぼす影響評価

近年の科学技術の発展に伴い、ヒトは様々な化学物質への曝露を避け得ない。中でも、妊娠期における化学物質曝露は母親のみならず、胎児への影響も懸念され、化学物質の発生毒性評価が求められる。現在、発生毒性評価は胎児に着目した *in vivo* 試験法が存在するが、発生毒性においては毒性発現部位が母体・胎盤・胎児と複数存在する。なかでも胎盤については、妊娠期において胎児が酸素供給や器官形成が依存する場所であり、胎盤機能に障害が生じると流産・早産や胎児毒性にも影響が生じることが想像に難くない。従って、従来の「化学物質の胎児への毒性」のみならず、「化学物質の胎盤への毒性」を評価することで、正確な発生毒性評価につながると考えられる。胎盤は

妊娠維持に必須の器官であり、hCG、ヒト胎盤性ラクトゲン (hPL、gene name ; *CSH1*) など胎児発育や子宮環境調節の役割を担う複数のホルモンを産生している。これらホルモンのレベルは妊娠の進行に伴い適切に変化するが、ホルモンレベルが異常値を示すと、流産や器官形成異常などに繋がり得る。そこで本研究では、化学物質が妊娠期における胎盤ホルモンへおよぼす影響評価系を構築することで、「胎盤への毒性を評価する系」の確立を目指す。

これまでに研究代表者らは、先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸 (VPA) が BeWo において、hCG の発現上昇、ならびに、hPL の発現減少を引き起こすことを見出してきた。本年度は、VPA による胎盤ホルモン変動機序の解明を試みた。まず、VPA を添加した BeWo について、網羅的な遺伝子発現変動解析 (RNA-seq) を実施した (図 9A)。遺伝子発現データを用いて、Pathway 解析を実施したところ、VPA 添加により発現減少した遺伝子群の Pathway 候補として、HIF-1 Pathway 遺伝子群を抽出できた (図 9B)。そこで、VPA を添加した際の HIF-1 α の発現量を解析したところ、HIF-1 α の発現が経時的に減少することが示された (図 10A)。また、RT-PCR により、HIF-1 の下流遺伝子 (*ADM*、*HK2*、*FOS*) の発現量がいずれも VPA 添加により減少することが認められた (図 10B)。従って、VPA が HIF-1 Pathway を阻害し得ることが示された。

さらに、HIF-1 Pathway の阻害が胎盤機能へおよぼす影響を評価するため、HIF-1 下流分子の 1 つであり、胎盤機能と密接に関連する GLUT1 に着目した。GLUT1 は胎盤における主要なグルコーストランスポーターであり、胎盤から胎児へのグルコース供給機能を担う重要な分子である。胎児はグルコースの供給を完全に母体に依存しており、胎盤からのグルコース供給不全が起きると胎児の発育に負の影響をおよぼすことが報告されている。そこで、BeWo に VPA を添加した際の GLUT1 の発現量を Western Blotting により解析したところ、VPA の添加濃度依存的に発現量が減少することが示された (図 11A)。また、GLUT1 の発現量が減少したことを受け、BeWo におけるグルコース取込量を、蛍光グルコースを用いて評価したところ、VPA 添加群において BeWo へのグルコースの取り込み量が抑制されることが示された (図 11B)。今後は、VPA による胎盤ホルモンの変動、HIF-1 Pathway の阻害、胎盤

におけるグルコース取り込み能との連関を追究すると共に、*in vivo* で VPA を投与した際に、*in vitro* の結果との相関性を検証していくことで、VPA による胎盤毒性の発現機序解明を目指す。

E. 結論

本年度は、①医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子のマウス胎盤形成期における影響、②ヒト妊娠性絨毛がん細胞株である BeWo における、銀ナノ粒子曝露による合胞体化の抑制には、cAMP/PKA シグナルの変動や酸化ストレスの産生が関与し得ること、③製造量も多く身の回り品に汎用されている非晶質ナノシリカが、BeWo における hCG の遺伝子発現量を減少し、forskolin により誘導される合胞体栄養膜細胞の形成を抑制し得ることを示した。さらに、④トランスウェルにおける胎盤関門モデルの作成において、サイトトロホブラスト層と比較し、シンシチオトロホブラスト層で傍細胞経路を介した化合物の透過性が大きくなることが示唆された。また、⑤先天性異常を誘発することが知られているバルプロ酸の BeWo に対する曝露が、hCG の遺伝子発現量の増加や HIF-1 Pathway の阻害、細胞内へのグルコース取り込みの抑制を引き起こし得ることを明らかとした。以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、NM や化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初年次計画の予定通り達成できている。また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している (G. 研究成果参照)。

近年、低出生体重児や早産の母体などが飛躍的に増加し、少子高齢社会の大きな問題となっている。本観点から、化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されている。一方で、化審法に基づくリスク評価において対象とされる評価項目の中でも、化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性等の問題から、行政判断に活用できる十分な情報が世界的に観ても圧倒的に不足している。さらに化審法をはじめとする化学物質に係る厚生労働行政においては、基本的に、化学物質の構造式 (物質名) で規制されており、化学物質の粒子サイズや形状といった物性の違

いと毒性発現の連関は十分に考慮されていない。こうした観点から、本研究は化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明により、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームを構築するものであり、生殖発生毒性学的観点からの化学物質のリスク解析基盤を構築し、リスク管理に係る新たな政策形成に資する知見の提供に大きく貢献するのみならず、化審法における化学物質のリスク評価に資する毒性情報の創出や OECD テストガイドラインへの展開に資する知見の集積につながる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppress retinoic acid-induced neuronal differentiation in human-derived neuroblastoma SH-SY5Y cells., ACS Appl. Nano Mater., 5: 19025-34, 2022.
2. Sakahashi Y., Yamamoto R., Kitahara G., Izutani R., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles decrease human chorionic gonadotropin β expression during syncytialization of BeWo cell., BPB Reports, 5(6): 154-8, 2022.
3. Sakahashi Y., Higashisaka K., Isaka R., Izutani R., Seo J., Furuta A., Yamaki-Ushijima A., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppressed forskolin-induced syncytialization in BeWo cells., Nanotoxicology, 16(9-10): 883-94, 2022.

【総説・その他】

1. Higashisaka K. : Health effects and safety assurance of nanoparticles in vulnerable generations., Biol. Pharm. Bull., 45(7): 806-12, 2022.
2. 東阪和馬, 山下琢矢 : 化学物質のヒト健康影響評価とリスク解析の今後～若手研究者目線で～. Yakugaku Zasshi. 143(2): 119-20,

2023.

3. 東阪和馬 : ヒトの健康へのリスク解析に資するナノマテリアルの神経細胞分化におよぼす影響とその機序解明. Yakugaku Zasshi. 143(2): 133-8, 2023.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬 : 食品中ナノマテリアルの安全性評価 : 安全なナノマテリアルの創製に向けた脳神経機能への影響評価., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 7 月. (シンポジウム : 食品安全に資する食品・食品添加物の健康影響評価と品質評価法の基盤開発)
2. 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性評価について. 第 24 回医薬品品質フォーラムシンポジウム, 東京 (東京), 2023 年 2 月. (シンポジウム : 欧州での食品添加物としての二酸化チタンの使用停止と医薬品規制への波及)
3. 東阪和馬 : ナノ粒子による胎盤毒性と次世代への影響., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月. (シンポジウム : 微粒子疾患の発症に関わる生体機構の解明と制御法開発)
4. 堤 康央, 辻野博文, 浅原時泰, 東阪和馬, 芳賀優弥 : はじめに ～生体外微粒子としてのナノ・マイクロプラスチックの生体影響評価～., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
5. 堤 康央, 芳賀優弥, 東阪和馬, 浅原時泰, 辻野博文 : 終わりに ～薬学的観点からのナノ・マイクロプラスチックの安全性評価～., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 小椋万生, 衛藤舜一, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカの鼻腔を介した吸入曝露が免疫系におよぼす影響の評価., 日本薬剤学会第 37 年会, オンライン, 2022 年 5 月.
2. 東阪和馬, 衛藤舜一, 小椋万生, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品中ナノマテリアルの安全性評価 : 獲得免疫系を介した非晶質ナノシリカのハザード解析とそ

- の発現機序解明., 第 47 回日本香粧品学会., 東京 (東京), 2022 年 6 月.
3. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 環境中のマイクロプラスチックの劣化状態を考慮した細胞毒性評価., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 6 月.
 4. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 活性酸素種の誘導を介した銀ナノ粒子による胎盤合胞体化の抑制., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 6 月.
 5. 東阪和馬, 坂橋優治, 北原 剛, 泉谷里奈, 小林純大, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノ粒子が胎盤細胞の合胞体化におよぼす影響評価., フォーラム 2022., 熊本 (熊本), 2022 年 8 月.
 6. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 胎盤形成段階の細胞合胞体化に着目したナノマテリアルの影響評価., 第 21 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフォーラム 2022., 名古屋 (愛知), 2022 年 9 月.
 7. 北原 剛, 東阪和馬, 坂橋優治, 泉谷里奈, 小林純大, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 奥野和香子, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: パルプロ酸による胎盤ホルモンが攪乱するメカニズム解明., 第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会., 枚方 (大阪), 2022 年 10 月.
 8. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 環境中の表面性状を模擬したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明., 第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会., 枚方 (大阪), 2022 年 10 月.
 9. 小林純大, 東阪和馬, 奥野和香子, 坂橋優治, 北原 剛, 泉谷里奈, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 野村鉄也, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 堤 康央: シンシチオトロホプラスチック層に着目した化学物質の胎盤透過性評価に適う in vitro モデル系の構築に向けた研究., 日本薬物動態学会第 37 年会., 横浜 (神奈川), 2022 年 11 月.
 10. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
 11. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 表面劣化したマイクロプラスチックの細胞毒性発現機序の解明., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
 12. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによる妊娠転帰への影響と炎症応答との関連追究., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.

【国際学会発表】

1. Higashisaka K., Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Safety evaluation of nanomaterials as a pharmaceutical base material: Hazard analysis of silver nanoparticles focusing on cranial nerve function, CRS 2022 Annual Meeting, Montreal (Canada), 11-15 July, 2022.
2. Haga Y., Okumura M., Konishi H., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Dynamics of amorphous silica nanoparticle in neural cell and microglia cell, CRS 2022 Annual Meeting, Montreal (Canada), 11-15 July, 2022.
3. Higashisaka K., Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppressed retinoic acid-induced neuronal differentiation in SH-SY5Y cells., The XVIth International Congress of Toxicology, Maastricht (Netherlands), 18-21 September, 2022.
4. Sakahashi Y., Higashisaka K., Izutani R., Seo J., Kitahara G., Kobayashi J., Nakamoto Y., Yamamoto R., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles inhibit intercellular fusion in the BeWo syncytialization process.,

The XVIth International Congress of Toxicology, Maastricht (Netherlands), 18-21 September, 2022.

5. Higashisaka K., Eto S., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Hazard analysis of amorphous silica nanoparticle via acquired immune system., AAPS 2022 PharmSci 360, Boston (USA), 16-19 October, 2022.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

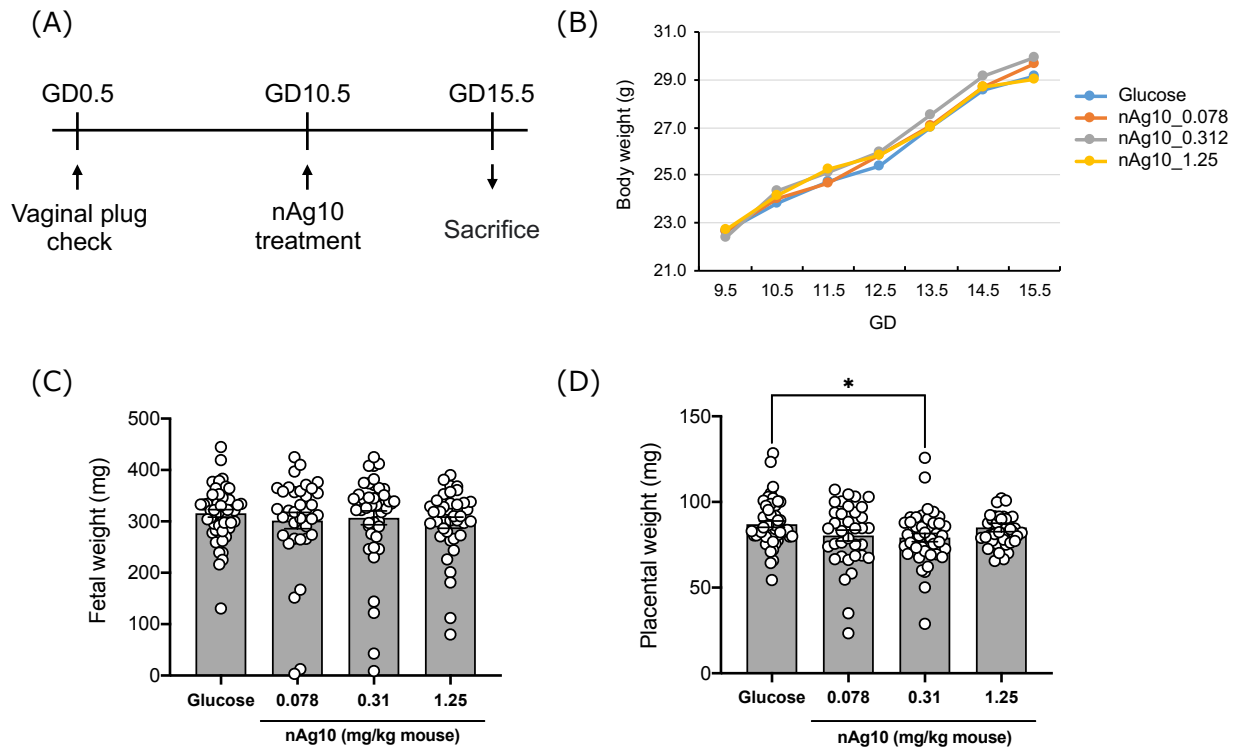


図1 : 妊娠マウスへのnAg10単回投与の影響評価

(A) 妊娠10.5日目のBALB/cCrSlcマウスに、グルコース溶液またはnAg10 (0.078, 0.3125, 1.25 mg/kg mouse) を単回尾静脈投与した。妊娠15.5日目に麻酔下で解剖を実施し、(B) 母体体重、(C) 胎仔重量、および、(D) 胎盤重量を測定した。The results presented here are pooled from two independent experiments. Glucose; n = 53, nAg10-0.078; n = 35, nAg10-0.312; n = 43, nAg10-1.25; n = 38. Data are presented as means \pm S.D.; * P < 0.05.

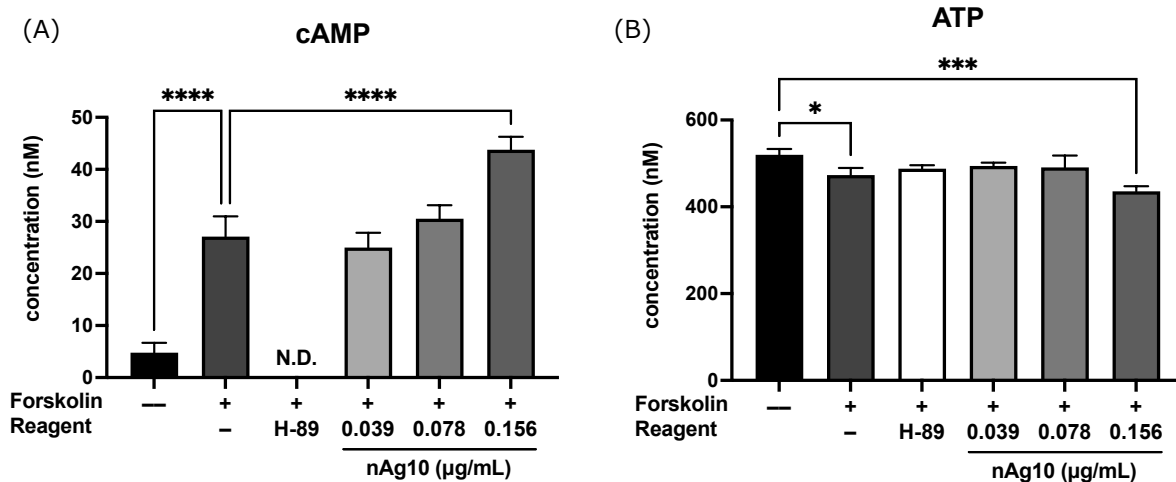


図2 : nAg10処置時のATPおよびcAMP産生変動

未分化のBeWoに、nAg10を0, 0.039, 0.078, 0.156 μ g/mLの濃度で50 μ M forskolinとともに処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μ M) の共処置群を設定した。48時間後に、cAMP-Glo AssayまたはCellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assayを用いて、(A) cAMP濃度および(B) ATP濃度を測定した。Data are presented as means \pm S.D. of three independent experiments; * P < 0.05, *** P < 0.001, **** P < 0.0001. N.D.; Not Detected.

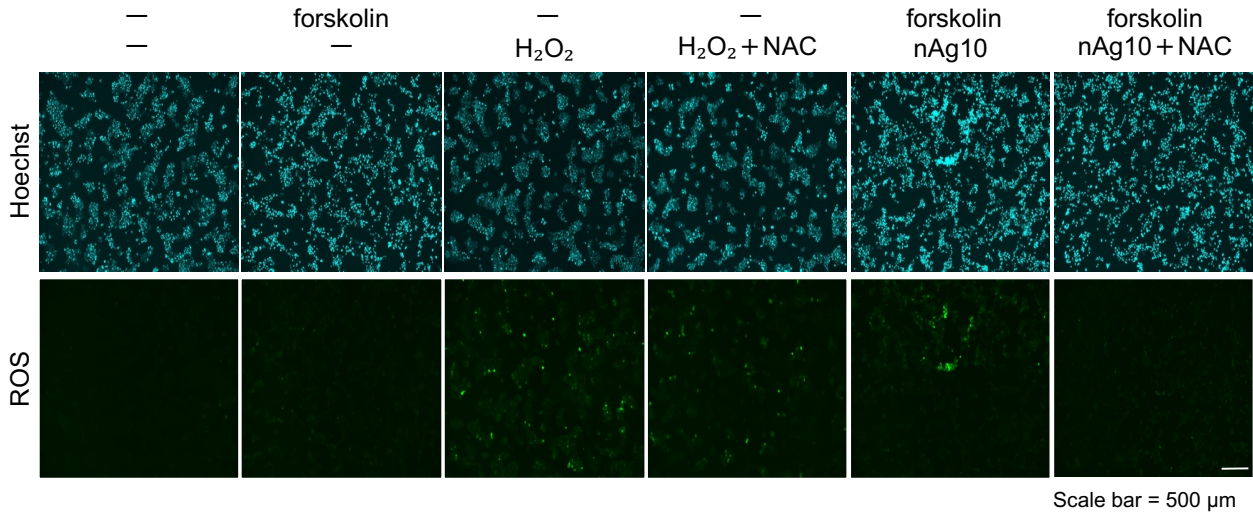


図3 : nAg10処置時の細胞内ROS産生評価

未分化のBeWoに、nAg10を0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で50 μM forskolinとともに処置した。またROS産生の対照群として、 H_2O_2 (100 μM) 処置群を設定した。抗酸化剤としては、N-アセチルシステイン (NAC; 5mM) を処置した。各種試薬添加の48時間後に、BeWo細胞の核を Hoechst (Cyan : 上段) で細胞内のROSを CM- H_2DCFDA (green : 下段) を用いて検出した。

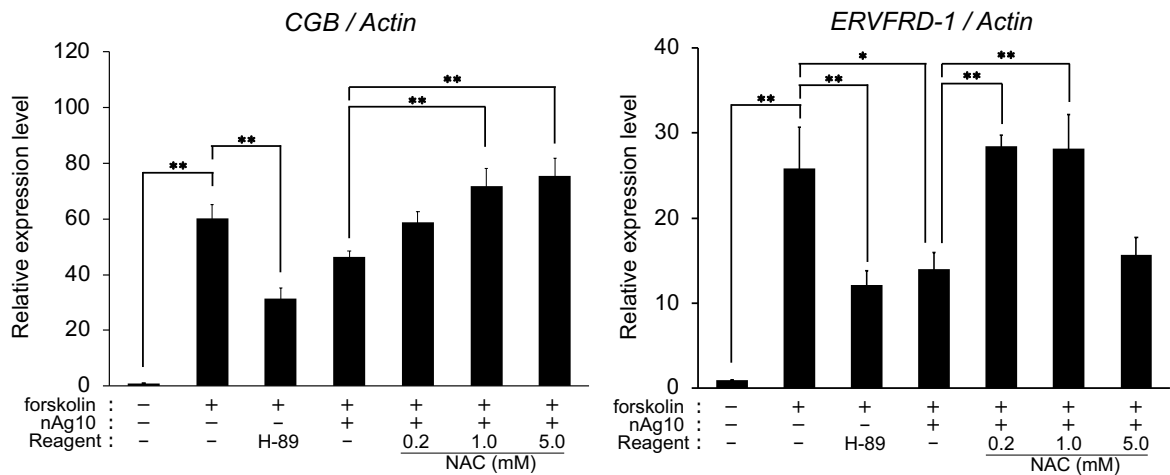


図4 : nAg10とNACの共処置時の合胞体化関連遺伝子の発現評価

未分化のBeWoに、nAg10を 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で50 μM forskolinとともに処置した。このとき、forskolin、nAg10とともに、抗酸化剤NACを0.2、1.0、5.0 mMの濃度で共処置した群を設定した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μM) の共処置群を設定した。48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 β -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

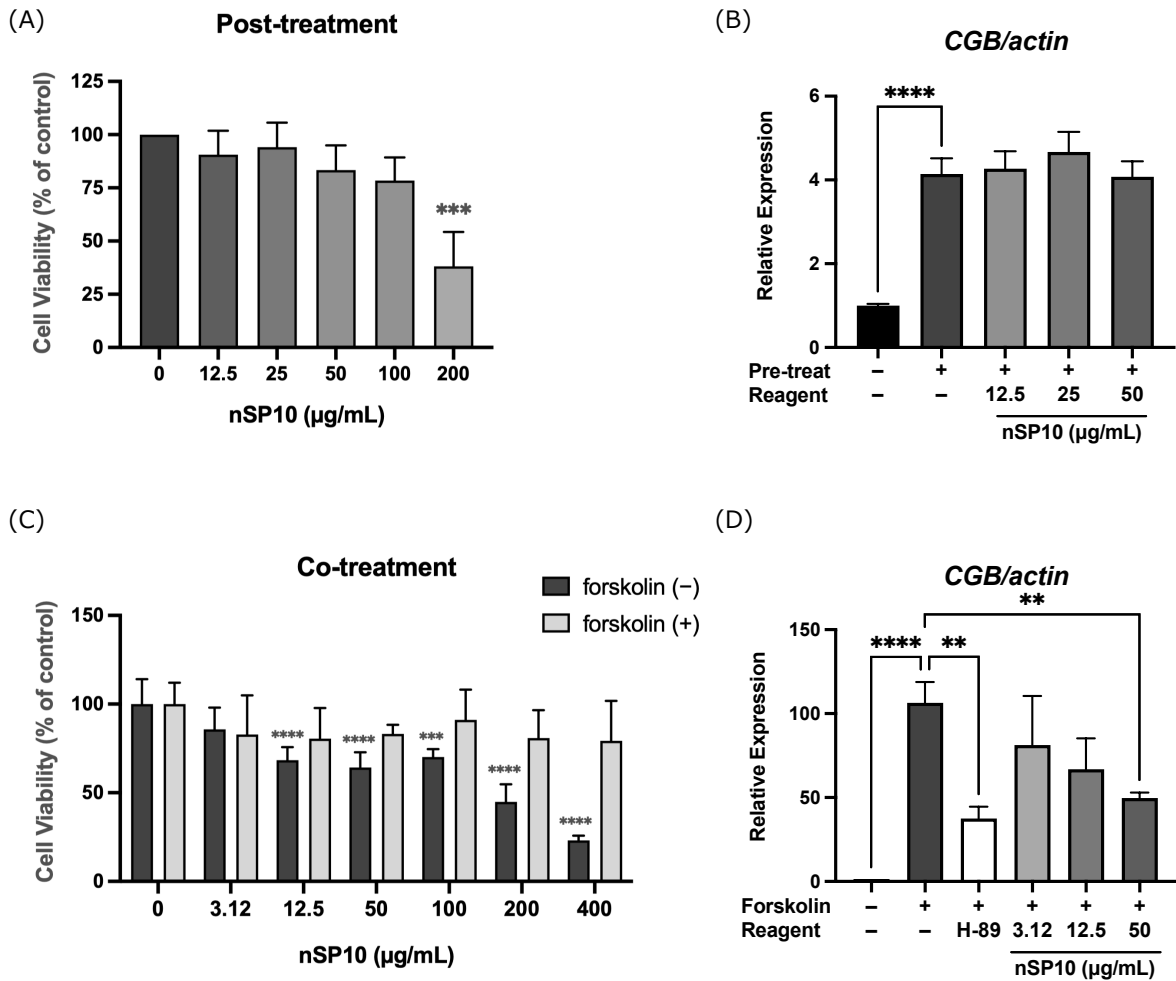


図5 : nSP10による細胞障害性とCGBの発現変動評価

(上段) 未分化のBeWoに、50 μM forskolinを24時間処置した後、nSP10を各濃度で72時間処置した。(下段) 未分化のBeWoに、nSP10を各濃度で50 μM forskolinとともに48時間処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μM) の共処置群を設定した。その後、(A、C) MTTアッセイにより細胞障害性を評価すると共に、(B、D) 細胞からRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供し、CGBの発現量を解析した。各群のmRNA発現量は、β-Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean ± SD (n=3) . ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

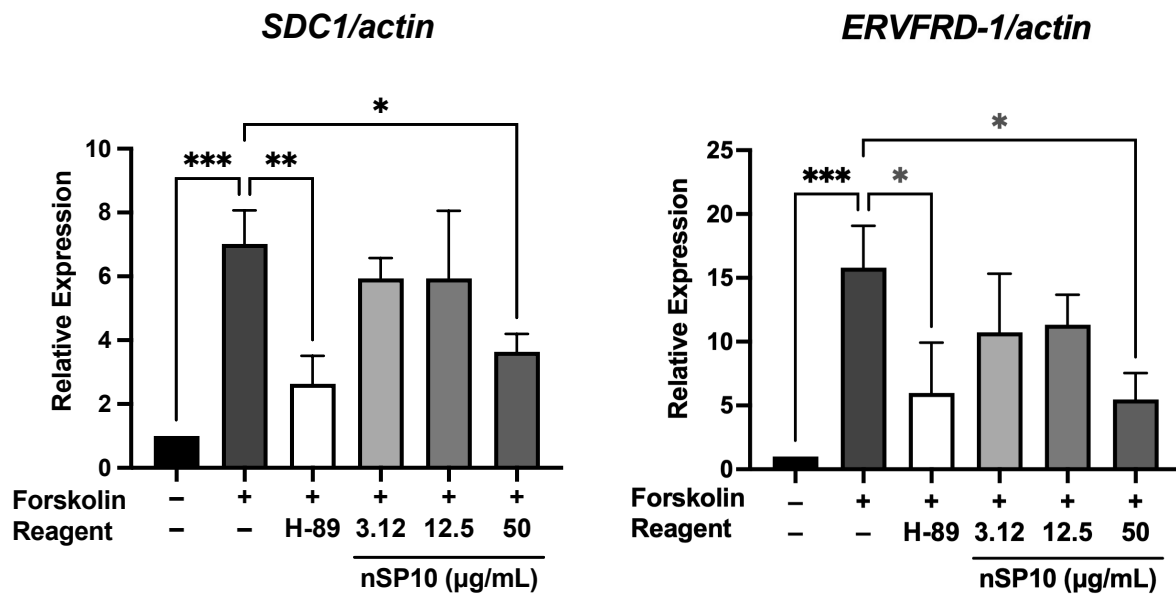


図6 : nSP10処置時の合胞体化関連遺伝子の発現評価

未分化のBeWoに、nSP10を 0、3.12、12.5、50 μg/mLの濃度で50 μM forskolinとともに処置した。また合胞体化抑制の対照群として、forskolinとH-89 (10 μM) の共処置群を設定した48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、β-Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean ± SD (n=3) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

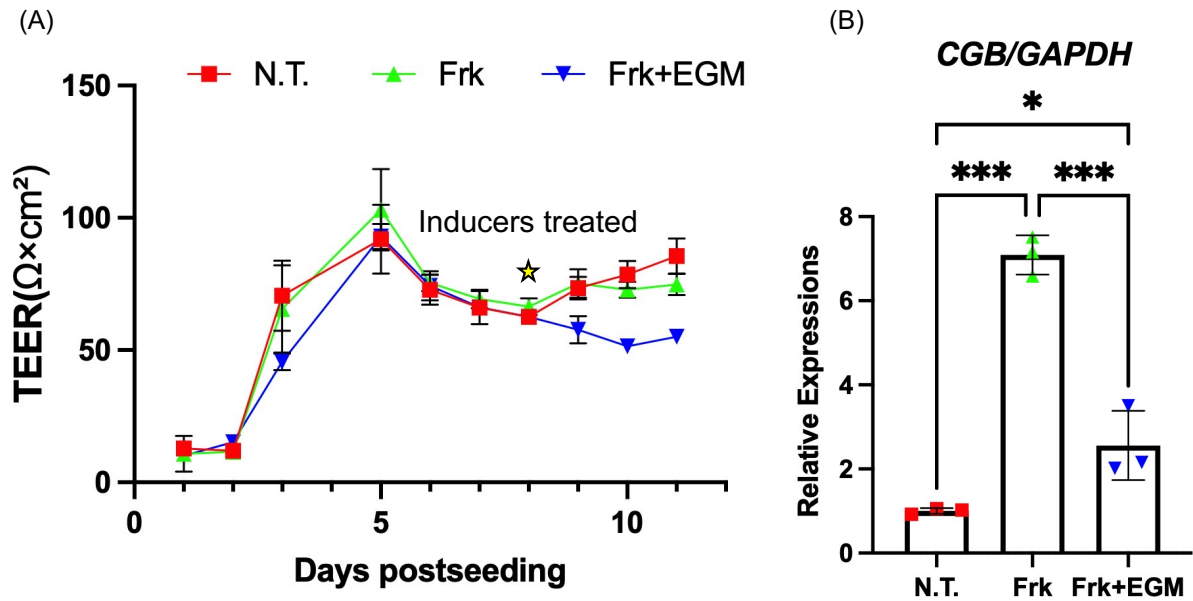


図7：胎盤関門構築とST層形成

(A) JEG-3をセルカルチャーインサートに播種し、24時間から48時間毎に12日間TEER値を測定した。播種後8日目の時点でForskolin (Frk) 及びEGMを処置し72時間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、24時間から48時間毎に8日から12日間抵抗値を測定した。同時に、細胞層の無い培養膜の抵抗値(ブランク)も測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を積算して細胞層のTEER値 (ohms × cm²) とした。(B) Forskolin及びEGMを処置し72時間培養後、細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、GAPDH標準化することで比較した。Data are presented as mean ± SD (n = 3). *P < 0.05, ***P < 0.001.

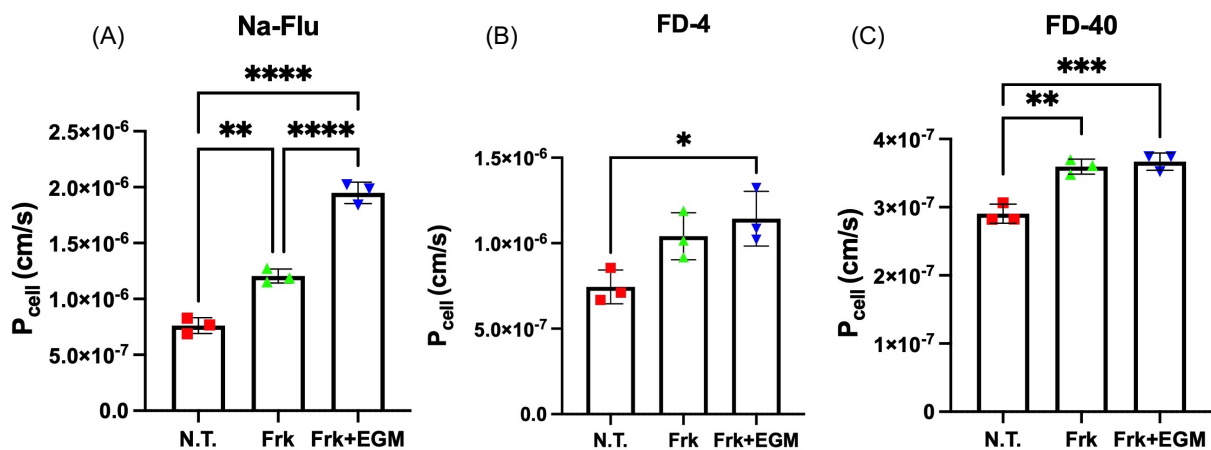


図8：モデル化合物の透過性評価

JEG-3にForskolin及びEGMを処置し72時間培養後、終濃度5 μMの (A) Sodium fluorescein (Na-Flu)、(B) 分子量4 kDaのFITC-dextran (FD-4)、(C) 分子量40 kDaのFITC-dextran (FD-40) を添加し、0、1、3、6、24時間後にサンプリングし、各層における蛍光強度を定量した。また、細胞層を介した見かけの物質透過係数 (P: apparent permeability coefficient) は下式より計算した。Data are presented as mean ± SD (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

$$1/P_{total} = 1/P_{cell} + 1/P_{membrane}$$

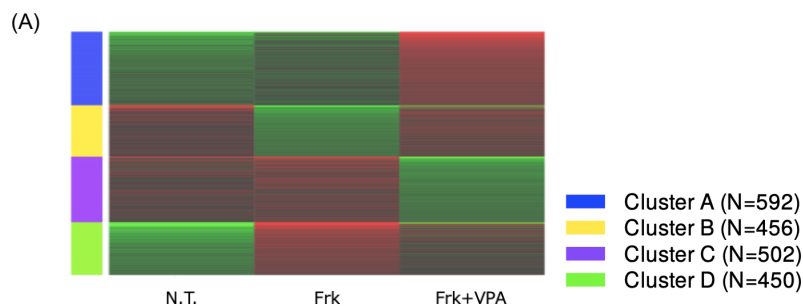
$$P = Q/(dC \times A \times t)$$

Q = the amount transported (mol)

dC = the difference in concentration between side A and side B (mol/L)

A = the area of the insert (cm²)

t = times (s)



(B) Frk処置により発現上昇・バルプロ酸添加により発現減少した遺伝子群のPathway

	Term	q-value
1	HIF-1 transcriptional activity in hypoxia	7.42E-06
2	Interleukin-2 signaling pathway	2.33E-05
3	BDNF signaling pathway	3.46E-05
4	EGFR1 pathway	1.26E-04
5	Interleukin-4 regulation of apoptosis	1.29E-04
6	Gastrin pathway	3.79E-04
7	Oncostatin M	0.00321
8	TSH regulation of gene expression	0.00321
9	FSH regulation of apoptosis	0.00324
10	Hormone ligand-binding G-protein coupled receptors	0.00417

Frk処置により発現減少・バルプロ酸添加により発現上昇した遺伝子群のPathway

	Term	q-value
1	Transmembrane transport of small molecules	0.120
2	Amino acid biosynthesis and interconversion	0.120
3	Amino acid transport across the plasma membrane	0.123
4	Transport of inorganic cations/anions and amino acids	0.148
5	Amino acid metabolism	0.148
6	SLC-mediated transmembrane transport	0.148
7	Small cell lung cancer	0.244
8	Integrin-linked kinase signaling	0.259
9	Stress induction of HSP regulation	0.284
10	Amino acid and oligopeptide SLC transporters	0.284

図9 : VPA曝露後のBeWoにおける発現変動遺伝子の網羅的な解析

未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPA (0.6 mM) を72時間添加した。細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、RNA-Seqに供した。(A) FPKM 0.5以上かつ、発現変動した上位2000個の遺伝子を用いてクラスター分類を行った後に(緑; 低発現、赤; 高発現)、(B) クラスターB、Dに対してPathway解析を実施した。

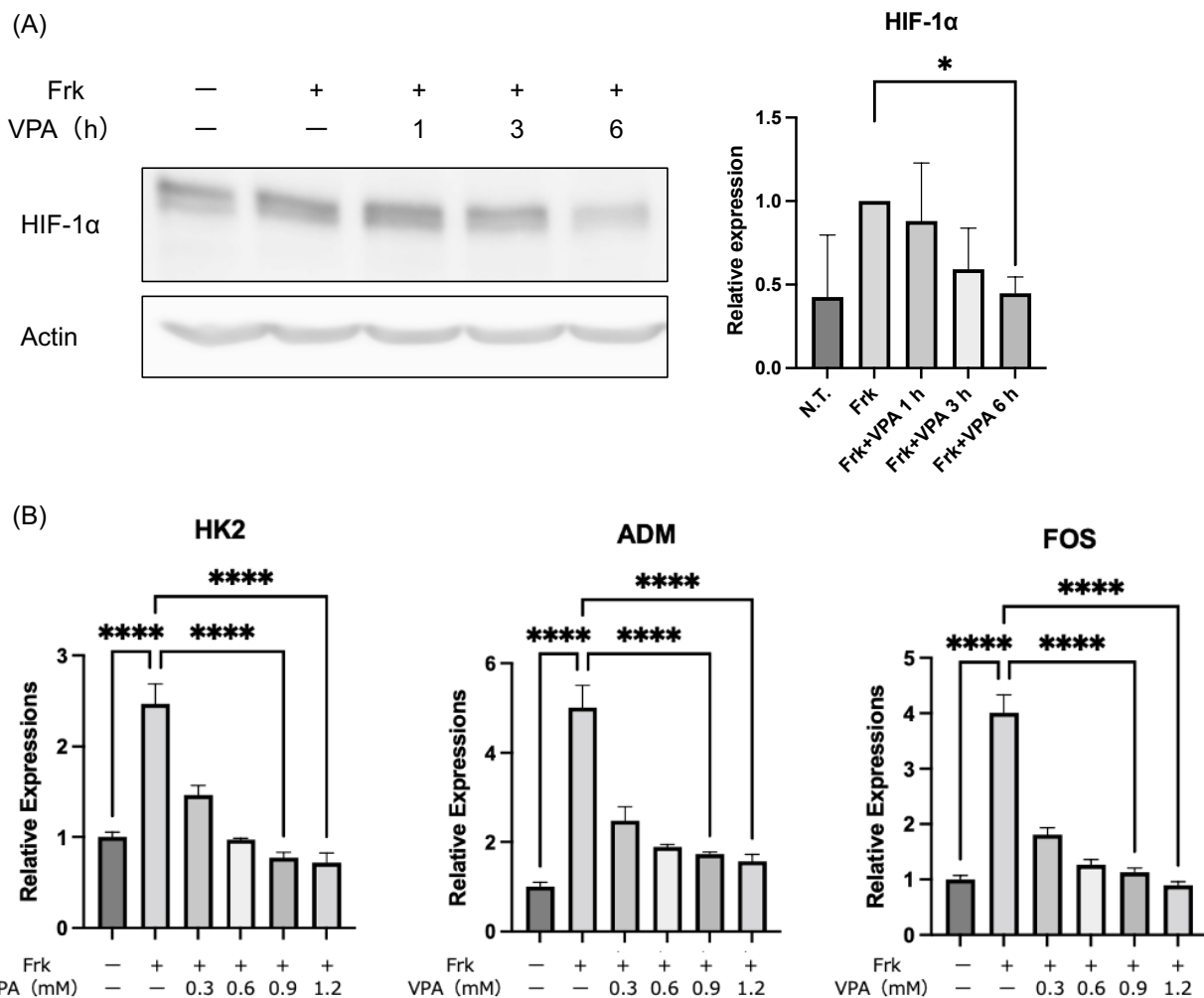


図10 : VPAによるHIF-1 α 、および、HIF-1下流遺伝子の変動評価

未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPA (0.6 mM) を1、3、6時間で経時的に添加した。(A) 細胞を回収しタンパク質を抽出、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、HIF-1 α の発現量を解析した。(B) 未分化のBeWoに50 μ M forskolinを24時間処置した後、VPAを72時間添加し、RNAを抽出した。各群のmRNA発現量は、GAPDHで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, **** P < 0.0001.

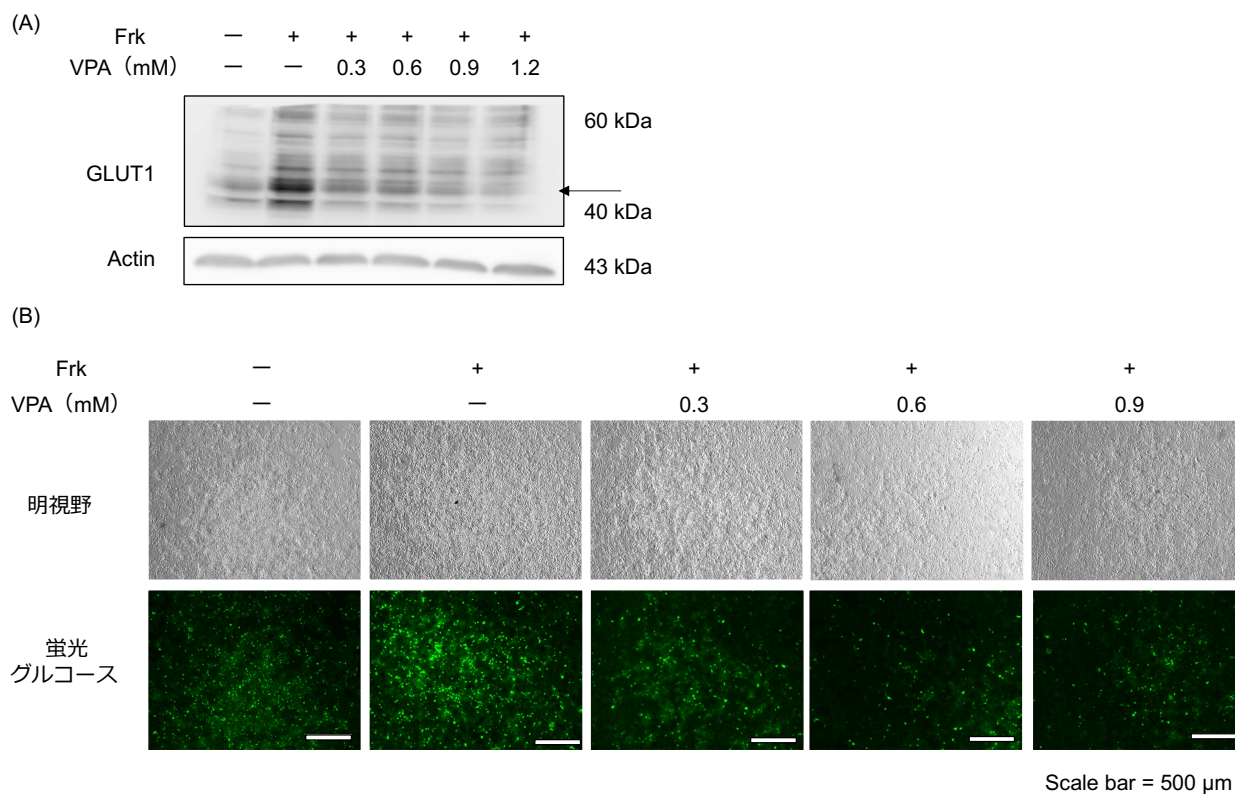


図11 : VPA曝露がBeWoにおけるグルコース取り込みにおよぼす影響評価

未分化のBeWoに50 μM forskolinを24時間処置した後、VPA (0.3、0.6、0.9、1.2 mM) を72時間添加した。(A) 細胞を回収しタンパク質を抽出、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、GLUT1の発現量を解析した。また、(B) 細胞を回収しwashした後、蛍光グルコースを添加して、蛍光顕微鏡により細胞内へのグルコース取り込み量を評価した。