

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22907

研究課題名（和文）尿・血中のmiRNAから必須元素の健康影響を予知・診断する

研究課題名（英文）Prediction and diagnosis of health effects of essential elements from miRNAs in urine and blood

研究代表者

矢嶋 伊知朗（Yajima, Ichiro）

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：80469022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：元素が与える健康影響をmiRNAの機能によって明らかにすることを目的とし、曝露試験を実施した。特に皮膚は様々な環境因子に曝露する最前線であるため、ヒト皮膚角化細胞及びメラノサイト細胞を用いて研究を実施した。同定された元素関連 miRNAに関してinhibitor, mimicタイプのmiRNAを用意し、transfectionを実施することで機能解析を行った。その結果、増殖活性、メラニン産生活性、アポトーシスに影響を及ぼすmiRNAが存在することが明らかとなった。これらの結果は、miRNAの機能を人工的に制御することで元素誘発性疾患の予防・治療法開発に寄与できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

元素はヒトが地球上で生きる上で決して避けて通れない物質であり、自身もまた元素で構成されている。一方でmiRNAはヒトの健康や疾病を予防・治療するための最先端のツールである。この「元素」と「miRNA」の関連性を機能的に解析した研究は皆無であり、新たな学術的意味を見出す研究と言える。また、今回明らかとなった「元素」と「miRNA」の関連性は、様々な疾患、特に元素に起因する疾患の予防や治療に大きく寄与する可能性を示しており、今後のより詳細な研究と予防法・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The exposure study was conducted to clarify the possible health effects of the elements through the function of miRNAs. In particular, since the skin is the frontline of exposure to various environmental factors, we conducted the study using human skin keratinocytes and melanocytes. We prepared inhibitor and mimic type miRNAs for the identified element-related miRNAs, and performed functional analysis by transfection. The results revealed that there are miRNAs that affect proliferative activity, melanogenesis, and apoptosis. These results suggest that artificial regulation of miRNA functions may contribute to the development of preventive and therapeutic methods for element-induced diseases.

研究分野：環境健康科学

キーワード：元素 miRNA 皮膚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命は誕生(以前)から死まで、常に(外部・内部)環境に曝され、様々な影響を受けている。それら生命体も環境因子も全て<元素>から構成されており、環境を解析する上でも、環境によって影響される生命現象、特にヒト疾患を解析する上でも、元素を主体とした研究手法は極めて重要である。

近年、リボ核酸(RNA)の一種で極めてサイズの小さい、マイクロ RNA (microRNA, miRNA) が体内で数千種類発現しており、様々な疾患の発症や抑制に作用していることが明らかにされている。miRNA は血中や尿中に多量に分泌されるため体液からの検出が容易であり、様々な miRNA の組み合わせで検出することにより、多種の疾患を診断、或いは予知することが可能となっている。

環境因子としての元素に、ヒトは様々な経路で曝露する。日本では食生活特有な毒性元素の曝露(ひじきには3価無機ヒ素(As³⁺)が多量に含まれる)の事例が存在する。また、食生活の中で様々な元素を「単独では毒性が発揮されないレベル」で摂取しており、複合曝露による影響は無視できない。

環境中の元素或いは生命体に含まれる元素の動態分析だけではヒト疾患との関連性、疾患発症機構、或いは予知法、診断法を明らかにするのは難しく、生命が疾患を発症する際に引き起こされる分子レベルの変化(遺伝子発現、遺伝子変異、タンパク質変化)を同時に検出することで初めて可能となる。

近年注目されている miRNA は、血中や尿中に多量に分泌されるため体液からの検出が容易であり、様々な miRNA の組み合わせで検出することにより、多種の疾患を診断、或いは予知することが可能となっている。実際、2017年には国立がん研究センターが主導となり、血中 miRNA を検出することで13種類のがんを早期発見する新たな検査手法の臨床試験が開始されており、miRNA を利用した検査手法は今まさにホットな分野として多くの研究が実施されている。

2. 研究の目的

環境因子としての元素は様々な経路で曝露する。日本では精密機器労働現場で使用される高濃度の毒性元素による曝露や、ひじきに含まれる毒性の高い3価の無機ヒ素(As³⁺)を食べることによる健康リスクが懸念されている。それ以外にも、食生活の中で様々な元素を「単独では毒性が発揮されないレベル」で摂取しており、複合曝露による影響は無視できない。特に元素自身が疾患発症の元凶ではなく、他の要因(遺伝的要因や喫煙等の特定の因子)が原因となる疾患の発症リスクを押し上げる「修飾因子」としての役割を果たしていることが予想される。元素が与える健康影響を miRNA の機能によって明らかにすることを目的とし、曝露試験を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、「元素」と「miRNA」の関係性をより複合的に、より詳細に検証するため、様々な培養細胞を用いて検証を行った。特に皮膚は経口・経皮など、曝露経路が複数あり、環境因子の重要なターゲットであることから、皮膚を構成する角化細胞及びメラノサイトをターゲットとして検証を行った。

【細胞生存率アッセイ】

ヒト皮膚角化細胞、ヒトメラノサイト細胞を6-well, 24-well, 96-well plateに播種し、各元素を単独及び複合的に曝露を実施、24-96時間後に細胞生存率等を測定した。複合曝露においては、濃度を各単独曝露における細胞生存率の変化が認められた上限及び下限を最小・最大値とし、3倍単位で濃度の異なる元素の組み合わせでアッセイを行った。

【メラニン産生測定】ヒトメラノサイトを6-well plateに播種し、各元素を単独及び複合的に曝露を実施、24-96時間後にメラニン産生量および細胞生存率を測定し、細胞単位あたりのメラニン量を算出した。

【miRNA 発現解析】

各元素を単独及び複合的に曝露を実施、24-96時間後に miRNA を回収・精製した。Realtime-PCR法を用いて様々なタイプの miRNA の発現解析を行った。

【miRNA 機能解析】

同定された元素関連 miRNA に関して inhibitor, mimic タイプの miRNA を用意し、transfection を実施することで機能解析を行った。Transfection 後元素曝露を実施し、24-96時間後に細胞生存率等を測定した。また、mRNA を精製し、RT-realtime PCR 解析を行うことで、元素関連遺伝子や細胞増殖、細胞死、細胞移動関連遺伝子の発現パターンを解析した。さらには、同様の曝露タイミングでタンパク質精製を行い、元素関連タンパク質や細胞増殖、細胞死、細胞移動関連タンパク質の発現パターン及びシグナリ伝達経路の変化を解析した。

4. 研究成果

【単独曝露による、細胞の生存や増殖に関する影響】

本研究では、必須元素のうち、カリウム、カルシウム、鉄、マンガン、亜鉛についてその影響を検証した。低濃度曝露(培養液中の各元素の濃度を低濃度に抑制する)の場合、どの元素におい

ても 24 時間曝露ではその生存率に影響は観察されなかったが、72-96 時間後にはすべての元素の単独曝露において、生存率の低下が観察された。この現象は、必須元素であるこれらの元素の濃度が通常世に低く設定されたため、細胞内のエネルギー産生やシグナル経路に重大な影響を及ぼし、結果として細胞生存率の低下に繋がったと考えられる。

高濃度曝露では、すべての元素において一定レベルの細胞増殖活性の増加が認められた。特に鉄とマンガンにおいては、増殖活性が 2-8 倍に増加する現象が確認された。鉄及びマンガンはこれまでの研究においても様々な細胞種において細胞増殖を活性化する報告があることから、本研究においても同様の活性を示したと考えられる。また、いずれの元素もより高濃度の曝露では細胞死を誘導した。

【複合曝露による、細胞の生存や増殖に関する影響】

元素複合曝露では、鉄とマンガンを中心に他の元素を組み合わせることで複合曝露の影響を調査した。鉄との組み合わせではカリウム、亜鉛は細胞増殖活性を上昇させ、カルシウムはその逆に、細胞増殖活性を低下させた。マンガンとの組み合わせの場合、カリウム、カルシウムは細胞増殖活性を上昇させ、亜鉛はその逆に、細胞増殖活性を低下させた。これらの結果は、単独曝露では細胞増殖活性を上昇させる各元素も、組み合わせによってはその活性をより上昇させるあるいは逆に低下させる性質を発揮することを示している。これは、これまでの研究の多くが単独曝露によるヒトへの影響を調査するものであり、より正確な影響を明らかにするためには、より積極的に元素複合曝露の研究を実施することが有効であることを示している。

【単独・複合曝露による、メラニン産生活性への影響】

各元素が、単独及び複合曝露においてメラニン産生に影響を及ぼすかどうかを検証した。単独曝露においては、鉄、カルシウムはメラニン産生活性を上昇させ、カリウム、マンガン及び亜鉛はメラニン産生活性を低下させた。複合曝露においては、鉄によるメラニン産生活性上昇は、マンガン及び亜鉛によって阻害された一方、カリウムは影響を及ぼさなかった。マンガンとの組み合わせの場合マンガンによるメラニン産生活性の低下は、鉄及びカルシウムによって阻害された。これらの結果は、各元素が持つメラニン産生に対する活性化あるいは阻害の性質をお互いの元素に対して及ぼし合うことが可能であることを示唆している。

【単独曝露による、miRNA 発現パターン解析】

元素単独曝露による細胞への影響を明らかにした後、曝露が miRNA の発現に影響を与えるかどうかを検証した。検証した miRNA はこれまでに皮膚細胞への影響が報告された 8 種類 (#001-#008) を用いた。解析の結果、候補 miRNA は角化細胞とメラノサイトの増殖活性に影響を与える miRNA (#001, #002, #003)、角化細胞とメラノサイトのアポトーシスに影響を及ぼす miRNA (#004, #005, #006)そしてメラノサイトにおいてメラニン産生に影響を及ぼす miRNA (#007, #008)の 3 グループに大別された。この結果は、候補 miRNA が細胞の表現型発露に重要な機能を果たしており、これまで知られていない新たなネットワークが存在することを示唆している。

【複合曝露による、miRNA 発現パターン解析】

miRNA の元素による発現パターンの変化は複合曝露によって変化することが仮説として成り立つことから、鉄及びマンガンを中心とした各元素との複合曝露による miRNA の発現パターン解析を行った。単独曝露においてグループ化された各 miRNA(増殖活性グループ:#001, #002, #003、アポトーシスグループ#004, #005, #006、メラニン産生グループ#007, #008)について、発現パターンの比較を行った。鉄と他の元素の組み合わせでは、#001, #005, #007 の発現パターンに変化が認められ、マンガンと他の元素との組み合わせでは、#002, #003, #004, #008 の発現パターンに変化が認められた。#001, #005, #007 の miRNA はいずれも MAPK 経路における分子をターゲットとしており、鉄を中心とした元素曝露による影響が MAPK シグナルの活性化に関連している可能性が示唆された。#002, #003, #004, #008 の miRNA のうち、#003, #004 は E-box 結合型の転写調節因子をターゲットとしていることが報告されている。また、#002, #008 の miRNA は核内レセプターをターゲットとしていることが報告されていることから、マンガンを中心とした元素曝露による影響は主に遺伝子の転写調節機構に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。

【miRNA の元素曝露に対する機能解析】

同定された元素関連 miRNA に関して inhibitor, mimic タイプの miRNA を用意し、transfection を実施することで機能解析を行った。その結果、#004 の miRNA の活性を変化させることで、鉄を中心とした単独・複合曝露による細胞増殖活性に変化を及ぼすことが明らかとなった。また、#007, #008 の miRNA の機能阻害は、元素曝露によるメラニン産生の変化を抑制することが明らかとなった。

これらの結果は、miRNA の機能を人工的に制御することで元素誘発性疾患の予防・治療法開発に寄与できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchiyama Tomoyuki, Tazaki Akira, Al Hossain MM Aeorangajeb, Yajima Ichiro, Ahsan Nazmul, Akhand Anwarul Azim, Hashimoto Kazunori, Ohgami Nobutaka, Kato Masashi	4. 巻 188
2. 論文標題 Increased levels of renal damage biomarkers caused by excess exposure to trivalent chromium in workers in tanneries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 109770 ~ 109770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envres.2020.109770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Masashi, Ohgami Nobutaka, Ohnuma Shoko, Hashimoto Kazunori, Tazaki Akira, Xu Huadong, Kondo-Ida Lisa, Yuan Tian, Tsuchiyama Tomoyuki, He Tingchao, Kurniasari Fitri, Gu Yishuo, Chen Wei, Deng Yuqi, Komuro Kanako, Tong Keming, Yajima Ichiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Multidisciplinary approach to assess the toxicities of arsenic and barium in drinking water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12199-020-00855-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Al Hossain M.M. Aeorangajeb, Yajima Ichiro, Tazaki Akira, Xu Huadong, Saheduzzaman Md, Ohgami Nobutaka, Ahsan Nazmul, Akhand Anwarul Azim, Kato Masashi	4. 巻 229
2. 論文標題 Chromium-mediated hyperpigmentation of skin in male tannery workers in Bangladesh	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 611 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2019.04.112	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 He Tingchao, Ohgami Nobutaka, Li Xiang, Yajima Ichiro, Negishi-Oshino Reina, Kato Yoko, Ohgami Kyoko, Xu Huadong, Ahsan Nazmul, Akhand Anwarul Azim, Kato Masashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Hearing loss in humans drinking tube well water with high levels of iron in arsenic?polluted area	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45524-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kohta Tonegawa , Kazuma Mizuno, Ryota Shigefuku, Yoshimoto Suhara, Ichiro Yajima
2. 発表標題 MOLECULAR MECHANISMS OF NOVEL COMPOUNDS-MEDIATES ANTICANCER EFFECTS ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA.
3. 学会等名 SEATUC (Malaysia) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Moeka Sogo, Rio Rio, Yoshitomo Suhara, Ichiro Yajima.
2. 発表標題 EFFECTS OF LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDES ON UV-INDUCED SKIN CELL DAMAGE.
3. 学会等名 SEATUC (Malaysia) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rio Oki, Moeka Sogo, Yoshitomo Suhara, Ichiro Yajima.
2. 発表標題 The Effect of Low Molecular Weight Peptides on UV-Induced Melanin Production.
3. 学会等名 SEATUC (Malaysia) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Shigefuku, Kohta Tonegawa, Kazuma Mizuno, Yoshitomo Suhara, Ichiro Yajima.
2. 発表標題 Anticancer effects of the retinoid on lung cancer cells.
3. 学会等名 SEATUC (Malaysia) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------