

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590161

研究課題名(和文) 汎用難燃物質の発達期暴露により重症化したウイルス性肺炎での IL-24 の作用の解析

研究課題名(英文) The action of IL-24 involving the exacerbation of pneumonia in RSV-infected mice exposed perinatally to a brominated flame retardant.

研究代表者

渡辺 渡 (Watanabe, Wataru)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50399218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：汎用難燃物質TBBPAは周産期にマウスに曝露すると、仔マウスのRSウイルスによる肺炎が増悪するとともに特異的にIL-24遺伝子の発現が上昇する。本研究では、免疫染色法でこのタンパク質の肺組織での発現、特に肺胞マクロファージとその周辺での発現を確認した。そして培養マクロファージ細胞において、遺伝子とタンパク質の両面からこの現象を再現した。さらにTBBPAの曝露によるウイルス感染細胞内でのIL-24タンパク質の上昇は初期の感染防御因子であるTNF- $\alpha$ の産生減少に先立って見られ、この機序が病態の増悪化に深く関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal effects of perinatal exposure to a brominated flame retardant TBBPA on the exacerbation of RSV-induced pneumonia, mechanism of action of IL-24 on RSV infection was investigated. By immune histopathological analysis, increase of the expression of IL-24 was confirmed in the lung tissue of RSV-infected mice exposed perinatally to TBBPA. The expression of IL-24 was also found in RA264.7 cells by real-time RT-PCR and western blotting in vitro. Although correlation between increase of IL-24 and decrease of a proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  was observed in the RSV-infected cells, direct interaction of them could not be revealed due to the failure of RNAi against IL-24 gene. Increase of IL-24 induced due to TBBPA-exposure might affect the production of proinflammatory cytokine from macrophages, should result in disorder of immune system responding to RSV infection.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：RSV IL-24 臭素化難燃剤

### 1. 研究開始当初の背景

アジアで多く生産されてプリント基板やポリマー樹脂に汎用されているテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) は乳幼児などの発達期に影響し発育など健康被害を引き起こす危険性が懸念されている。そのため、乳幼児感染ウイルスである RS ウイルス感染マウスモデルを用いて、免疫毒性評価を実施した。その結果、この物質は従来安全性が高いと見積もられていたにも拘わらず、発達期暴露により仔マウスの肺炎が非常に重症化することを見出した。そして、TBBPA の作用点を明確にする必要があり、同様に発達期暴露後に RS ウイルスを感染させた仔マウスの肺組織について、マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、ウイルス感染時にのみ TBBPA 暴露で変動した遺伝子をリストアップしたところ、多様な生物活性が報告されているインターロイキン-24 (IL-24) の発現上昇が低用量から最上位に見出された。

### 2. 研究の目的

汎用難燃物質 TBBPA をマウスの発達期に暴露させることで、仔マウスに免疫毒性が表れ、RS ウイルス感染病態が重症化することが明らかとなった。そして、その際に肺組織で IL-24 の遺伝子発現が特徴的に上昇することが判った。本研究では、TBBPA による世代を超えた RS ウイルス感染病態重症化のメカニズムを解明するため、この IL-24 に着目して TBBPA による発現上昇の機序ならびに感染病態との因果関係を明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

**TBBPA の周産期曝露実験：** BALB/c マウス (雄 ; 8, 9 週齢、雌 ; 6, 7 週齢) を感染実験室内飼育ケージにて一週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より 11 日後 (GD10) から Soy-free 粉末食で TBBPA (100 ~ 10,000 ppm) を調製して混餌投与した出産後 21 日目 (PND21) に離乳を行い、通常飼育を行った。なお動物実験は、九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

**RS ウイルス感染実験 (in vivo)：** Respiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) A2 株はヒト咽頭ガン HEp-2 細胞で増殖・取得した。4 週齢の仔マウスにキシラジン・ケタミン混合麻酔液をマウス右大腿部に筋肉注射し、麻酔下で RS ウイルス  $3 \times 10^5$  PFU を経鼻感染させた。感染 5 日後に肺を無菌的に摘出し、OCT コンパウンドに浸潤させながら液体窒素中で急速凍結した。

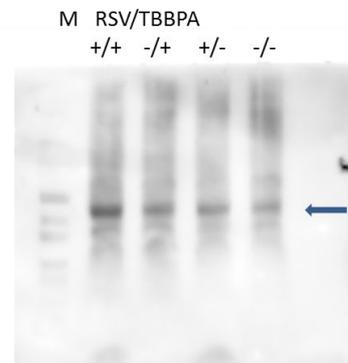
**IL-24 免疫組織染色実験：** ヤギ抗マウス IL-24 モノクローナル抗体 (R&D System) を用いて ABC 法により肺組織の免疫染色を実施した。なお、実施は株式会社札幌病理総合研究所に委託した。

**RS ウイルス感染実験 (in vitro)：** 培養マクロファージ細胞 RAW264.7 細胞を TBBPA と共に 24 時間培養し、その後 RSV A2 株を MOI=1 ~ 2 の感染価で感染させてさらに培養し、各種実験に用いた。IL-24 タンパク質の発現は感染 3 日後に RIPA バッファーで溶解させたのち、抗ヤギ抗マウス IL-24 モノクローナル抗体を用いて、ベータアクチンを対照にウェスタンブロッティングで解析した。IL-24 mRNA 量は、感染 2 日後から RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN Science) で RNA を抽出後、リアルタイム RT-PCR によりベータアクチンを対照遺伝子として測定した。なお、IL-24 遺伝子に対する siRNA はコスモバイオ社に委託作成し、導入時は 25 nM を基本として siQUEST (Takara) を用いてトランスフェクションした。

### 4. 研究成果

(1) TBBPA を周産期 (妊娠 10 日目 ~ 離乳時) に混餌投与で暴露 (0, 10,000 ppm) し、仔マウス (4 週齢) に RS ウイルス A2 株を経鼻感染させ、肺組織に IL-24 の発現をタンパク質レベルで確認するため、免疫染色法で検討した。感染後 5 日目において、ウイルス非感染マウスでは抗 IL-24 抗体はほぼ陰性なのに対して、RS ウイルス感染マウスでは、肺胞の実質組織でマクロファージなど免疫担当細胞が浸潤している領域にて陽性細胞が見いだされた。そして、この陽性細胞は TBBPA 投与群で顕著であった。この様に、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析で見出したサイトカイン IL-24 について、肺組織においてタンパク質レベルで発現上昇を確認できた。

(2) 培養マクロファージである RAW264.7 細胞を用いて、in vitro での TBBPA 処理時に RS ウイルス感染細胞で IL-24 の発現上昇がみられるか検討を開始した。リアルタイム RT-PCR により IL-24 の遺伝子発現は非感染より感染時に高く、TBBPA 10 $\mu$ M 処理では約 10 倍発現が上昇していた。同様の培養条件下、タンパク質レベルの検討について抗 IL-24 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検討した。その結果、RAW264.7 細胞においても TBBPA 処理により IL-24 タンパク質の上昇を確認できた (図)。



(3) IL-24 の発現変動にリンクするファクターを調べるために、RS ウイルス感染マウス(感染1日後)の肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン・ケモカインについてタンパクアレイを利用して解析した。複数のサイトカインの変動が認められた中で、RAW264.7 細胞での検証が可能な TNF- $\alpha$  の抑制効果が顕著であった。

(4) RAW264.7 細胞に TBBPA を曝露して RS ウイルスを感染させた。感染後 2 日目から IL-24 の遺伝子発現上昇が顕著になるのに対して、TNF- $\alpha$  は感染 24 時間以内に上昇し、2 日後にはタンパク質レベルで抑制されていることが判明した。これより、IL-24 は炎症惹起の誘導物質ではなく作用物質として初期の炎症を抑制することが示唆された。この効果を確認するために IL-24 siRNA 導入を実施して同様の試験を実施したが、RAW264.7 細胞への siRNA 導入効率が低く、検証ができなかった。

本研究期間を通じて、マウス肺組織を用いた DNA マイクロアレイで見出した現象から、免疫組織染色法によりタンパク質レベルで RS ウイルス感染病態における IL-24 の標的マクロファージに発現作用することを見出すことができた。そして、培養マクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、TBBPA 本体がリアルタイム PCR により mRNA レベルと抗 IL-24 抗体を用いたウェスタンブロット法で IL-24 タンパク質発現上昇に作用していることを明らかとした。IL-24 の上昇と TNF- $\alpha$  の抑制がリンクしていることを明らかにしたが、RNAi が本試験系では期待通りにワークせず、IL-24 の感染細胞内での働きをさらにクリアにすることができなかった。TBBPA は周産期における作用ばかりではなく、成体マウスの RS ウイルス感染病態も悪化させ、特に T 細胞系の質的な変化をもたらせることも分かってきた。この現象への IL-24 の関与も今後検証していき、環境衛生分野における汎用臭素化難燃物質の規制だけでなく RS ウイルス感染病理にも重要な情報を提供していきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Watanabe, W., Yoshida, H., Hirose, A., Akashi, T., Takeshita, T., Kuroki, N., Shibata, A., Hongo, S., Hashiguchi, S., Konno, K., Kurokawa, M. Perinatal exposure to insecticide methamidophos suppressed production of proinflammatory cytokines responding to virus infection in lung tissues in mice. *BioMed. Res. Int.* (2013) 2013, Article ID 151807, 7 pages. Doi:10.1155/2013/151807. 査読有

Takeshita, T., Watanabe, W., Toyama, S., Hayashi, Y., Honda, S., Sakamoto, S.,

Matsuoka, S., Yoshida, H., Takeda, S., Hidaka, M., Tsutsumi, S., Yasukawa, K., Park, Y.K., Kurokawa, M. Effect of Brazilian propolis on exacerbation of respiratory syncytial virus infection in mice exposed to tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant. *Evid.-Based Compl. Alt. Med.* (2013); 2013:698206. doi: 10.1155/2013/698206. 査読有

Takeda, S., Kawahara, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Watanabe, W., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Bumbein, D., Muguruma, M., Kurokawa, M. Effect of oral administration of probiotics from Mongolian dairy products on Th1 immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2013) 77, 1372-1378. 査読有

Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., Kurokawa, M. Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1276-1284. (2013) 査読有

Kan-o, K., Matsumoto, K., Inoue, H., Fukuyama, S., Asai, Y., Watanabe, W., Kurokawa, M., Araya, J., Kuwano, K., Natanishi, Y. Corticosteroids plus long-acting beta2-agonists prevent double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 on airway epithelium. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (2013)160, 27-36. 査読有

Konno, K., Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., Kato, M., Yamamoto, R., Kurokawa, M. Antiviral activities of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum* against respiratory syncytial virus, poliovirus, measles virus and herpes simplex virus type 1 *in vitro*. *Nat. Prod. Commun.* (2012) 6, 1881-1884. 査読有

Takeda, S., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kawahara, S., Yoshida, H., Watanabe, W., Muguruma, M., Kurokawa, M. Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1976-1983. (2011) 査読有

[学会発表](計 8 件)

橋口誠子、吉田裕樹、徳田健治、紺野克彦、明石 敏、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡

多層型カーボンナノチューブ曝露による RS ウイルス感染免疫への影響、日本薬学会第 134 年会、2014.2.28, 熊本、ポスター 28pmS-064

Wataru Watanabe, Hiroki Yoshida, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa Perinatal exposure to an insecticide methamidophos affected the immune response to virus infection in the next generation of mice. EUROTOX2013, (2013.9.2) (Interlaken, Switzerland), poster P11-15

渡辺 渡, 吉田裕樹, 広瀬明彦, 黒木奈緒, 本郷聡子, 紺野克彦, 黒川昌彦 有機リン系殺虫剤メタミドホスの周産期曝露による RS ウイルス感染免疫への影響、日本薬学会第 133 年会、2013.3.30, 横浜、ポスター 30pmE-205

Wataru Watanabe, Hiroki Yoshida, Akihiko Hirose, Katsuhiko Konno, Masahiko Kurokawa Effects of nanoparticles of titanium dioxide on the immune response to virus infection. EUROTOX2012, (2012.6.19) (Stockholm, Sweden), poster P20-02.

Watanabe, W., Yoshida, H., Hirose, A., Konno, K., Kurokawa, M.: Effects of the nanoparticles of titanium dioxide on the immune response to respiratory syncytial virus (RSV) infection in macrophages in vitro and mouse model in vivo. International Congress of Virology, 2011.9, Sapporo.

Yoshida, H., Kai, H., Tsutsumi, S., Yasukawa, K., Matsuno, K., Watanabe, W., Shiraki, K., Kurokawa, M.: Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of anti-herpetic efficacies. International Congress of Virology, 2011.9, Sapporo.

渡辺 渡, 吉田裕樹, 広瀬明彦, 紺野克彦, 山中沙代子, 黒木奈緒, 黒川昌彦: 酸化チタンナノ粒子のマクロファージおよびマウスモデルにおける RS ウイルス感染免疫応答における影響、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 29-31, 札幌.

RS ウイルス感染マウスモデルを用いた臭素化難燃物質の発達期免疫毒性の評価、渡辺 渡, 招待講演(ワークショップ)「発達期免疫毒性(developmental immunotoxicity)の評価方法」, 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会, 千葉, 2011.9

〔図書〕(計 2 件)

渡辺 渡(分担): 薬学領域の食品衛生化学、編集 長澤一樹、川崎直人、廣川書店、2013, 3,1.

黒川昌彦(分担): 薬学領域の生化学 “ 第 12 章 遺伝子工学の基礎 ”、編集 伊藤 晃、廣川書店、2013, 8. 1.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP : <http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 渡(WATANABE, Wataru)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授

研究者番号 : 50399218

(2) 研究分担者

黒川昌彦(KUROKAWA, Masahiko)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授

研究者番号 : 80186527

吉田裕樹(YOSHIDA, Hiroki)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・講師

研究者番号 : 90469411