

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00558

研究課題名(和文) ナノ粒子曝露により次世代の神経幹細胞に生じる機能障害とマイクロRNA制御異常

研究課題名(英文) Prenatal exposure to nanoparticle disrupt the expression level of microRNA and the function of neural stem cell in the brain of mouse offspring

研究代表者

立花 研 (Tachibana, Ken)

日本薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10400540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎仔期のシリカナノ粒子曝露により神経幹細胞に生じるマイクロRNA発現の変動とそれによって生じる遺伝的・機能的異常について検討を行った。

胎仔期にシリカナノ粒子を曝露したマウス(新生仔：1日齢)の神経幹細胞におけるマイクロRNA発現の網羅的解析を行った結果、神経幹細胞において多数のマイクロRNAに発現変動が認められた。そのうち1つのマイクロRNAについて標的遺伝子を検討した結果、神経系の発生・発達や機能の獲得に關与する遺伝子の制御に關与すると考えられた。

以上より、シリカナノ粒子胎仔期曝露による神経系への影響に、神経幹細胞におけるマイクロRNA発現制御異常が關与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we analyzed the effect of prenatal silica nanoparticle (SiO₂-NP) exposure on the expression levels of microRNA of neural stem cells (NSCs). Furthermore, we also analyzed the relationship between altered microRNA expression and the function of NSCs.

Pregnant mice were exposed to SiO₂-NP, and then, NSCs were obtained from brains which collected from 1-day-old offspring. Expression levels of microRNA of NSCs were disrupted by prenatal SiO₂-NP exposure. In addition, we predicted the target mRNAs of one microRNA, and then the function of these mRNAs were analyzed using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). The results showed these mRNAs were predicted to regulate the neural differentiation or maintenance of NSCs and acquire the function of neural cells.

These results suggested that disrupted microRNA expression induced by prenatal SiO₂-NP exposure associated with deregulation of mRNA expression and the gain of neural function of NSCs of offspring during development.

研究分野：環境衛生薬学、分子細胞生物学

キーワード：トキシコロジー 環境 衛生化学 ナノ粒子 マイクロRNA 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、転写産物の網羅的な解析が行われた結果、膨大な転写産物の多くがタンパク質をコードしないノンコーディング RNA であることが明らかになり、なかでも、マイクロ RNA は生命の陰のプログラムではないかと注目を浴びている。マイクロ RNA は対応する遺伝子 (mRNA) に作用することで mRNA を分解またはタンパク質の合成を抑制する。アポトーシス、細胞増殖、血球・神経・筋など組織の分化といった基本的な生体機能を制御していることが知られ、生物が生命を維持する上で重要な役割を果たしている。特に、マイクロ RNA の中には臓器特異的に発現するものが知られており、個体の発生・分化に不可欠な要素と考えられている。また、これまでに種々のがんや糖尿病などの病態に応じて特異的なマイクロ RNA 発現パターンを示すことが明らかとなっている。以上より、マイクロ RNA は生体の正常な発生・発達や健康状態と密接な関係があると考えられる。しかし、環境中に存在する化学物質や粒子状物質の健康影響へのマイクロ RNA の関与は全くと言って良いほど調べられていない。

我々はディーゼル排ガス (DE) の生体影響について、マウスを用いて胎仔期曝露の影響を検討した。その過程で、脳血管周囲細胞の変性、血管内皮やアストロサイトなどの細胞への影響などを明らかにした。加えて、脳内モノアミン濃度の変動、記憶学習能力の低下などの機能的変化が認められたことから脳神経疾患との関連に注目した。これらの影響は DE 中の粒子状成分 (特に粒径 100 nm 以下のナノ粒子) の除去によって軽減されることから、粒子状成分が重要であると考えられる。実際に、カーボンブラックナノ粒子 (DE 中に含まれる炭素核の粒子のモデル) を曝露した場合でも脳内に同様の組織学的な異常が認められた。さらに、化粧品や食品など様々な用途に用いられる二酸化チタンや酸化亜鉛などのナノ粒子の曝露によっても脳内モノアミン濃度の変動が認められ、種々のナノ粒子の胎仔期曝露が産仔の脳機能に影響を及ぼすことを明らかにした。器官形成段階である胎児期に受けた影響が不可逆的な変化として表れる場合、一度受けた影響が出生後も残り、疾病の発症につながる恐れがある。これまでに我々が行った研究では、DE やナノ粒子の曝露を胎仔期に限定して行っている。したがって、これまでに認められた障害は器官形成段階における発生や分化に生じた異常に起因する可能性が高い。近年、マウスにおいて胎仔期における親の食餌が産仔のマイクロ RNA 発現に影響を及ぼすことが報告されている。これらの報告から、胎仔期のナノ粒子曝露によって次世代に生じる脳神経系の健康影響にマイクロ RNA の発現変動が関与する可能性が考えられる。

胎仔期は個体の形成に向けて細胞の分化や淘汰、機能獲得といった発達が盛んに生じる期間であることから、脳神経系の正常な発達の要となる神経幹細胞の遺伝的・機能的変化に注目した。我々はこれまでに DE 胎仔期曝露によって神経幹細胞における分化・未分化の状態を示す遺伝子の発現量に変動が生じることを明らかとした。この結果は、DE 中のナノ粒子が神経幹細胞の性状・機能に影響を及ぼすことを示唆している。以上から、ナノ粒子曝露によって神経幹細胞にマイクロ RNA 発現異常が生じ、各種神経細胞の正常な増殖・分化や機能獲得が攪乱され、脳神経系の組織やネットワークの形成に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかとすることを目的とし、研究を行った。

- (1) 妊娠マウスにナノ粒子を曝露し、胎仔あるいは新生仔の脳から神経幹細胞を得る。得られた神経幹細胞のマイクロ RNA 発現量を網羅的に解析し、ナノ粒子の胎仔期曝露により発現変動するマイクロ RNA を明らかにする。
- (2) (1) で発現変動が見いだされたマイクロ RNA について、神経幹細胞あるいは各種神経系細胞に対する遺伝的・機能的な変化を検討する。
- (3) (1)、(2) で得られた結果から、ナノ粒子胎仔期曝露により脳組織に生じる機能的変化へのマイクロ RNA 発現変動の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物およびナノ粒子曝露

実験動物としてマウスを用いた。妊娠 10 日目にシリカナノ粒子 (粒径 100 nm) をマイクロスプレイヤー (Penn Century) を用いて経気道投与した。シリカナノ粒子は超純水に 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように懸濁し、妊娠マウス 1 匹あたり 25 μL を噴霧した。また、シリカナノ粒子をマイクロコン (Millipore) で除去した溶液を調製し、溶媒として投与を行った。投与後は通常と同様の飼育を行った。

(2) 神経幹細胞の単離および培養

シリカナノ粒子曝露後、新生仔 (1 日齢) から全脳を採取し、細切した後、Accumax (Innovative Cell Technologies) を用いて細胞を分散し、セルストレーナーを用いて分散されなかった細胞塊を除去した。得られた細胞群を専用の培地を用いて神経幹細胞を特異的に培養し、神経幹細胞を得た。得られた神経幹細胞は、無血清の培地に EGF (20 ng/mL)、basic FGF (20 ng/mL) を添加して培養することで維持した。

(3) マイクロアレイを用いたマイクロ RNA 発現変動の解析

(2)で得られた神経幹細胞から ISOGEN を用いて total RNA を抽出し、miRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いてマイクロアレイ解析に十分な純度に精製した。バイオアナライザー (Agilent) を用いて得られた total RNA 溶液にマイクロ RNA が含まれることを確認した後、マイクロアレイ解析 (3D-Gene mouse miRNA oligo chip [東レ]) を行い、シリカナノ粒子曝露により神経幹細胞で生じるマイクロ RNA 発現パターンの変動を解析した。

(4) 神経幹細胞で発現変動するマイクロ RNA が制御する候補遺伝子および機能の解析

(3)のマイクロアレイ解析で得られた結果から、発現変動するマイクロ RNA を抽出し、その中でも雌雄いずれの新生仔の神経幹細胞においても発現変動するマイクロ RNA に着目した。このマイクロ RNA について、*in silico* の解析ツールを用いて標的候補遺伝子を推定した。複数の解析ツールを用い、全ての解析ツールで共通に抽出される標的候補遺伝子群を見出した。この標的候補遺伝子群について、遺伝子機能を示す GO term によるバイオインフォマティクスを利用した解析を行い、機能的に分類を行った。

これらの解析から、シリカナノ粒子の胎仔期曝露により、産仔の神経幹細胞に生じる機能的な変化について検討を行った。

4. 研究成果

(1) シリカナノ粒子胎仔期曝露による産仔の体重および性比に及ぼす影響の解析

妊娠マウスに対し、100 µg/mouse のシリカナノ粒子 (粒径 100 nm) を経気道投与した。投与は、胎仔の器官の発生が急激に生じる胎齢 10 日目に行った。投与後は通常どおりの飼育を行い、出産後 1 日齢で試料を採取した。試料の採取に先立ち、産仔の体重および性比について検討を行ったところ、体重および性比のいずれについても溶媒投与群とシリカナノ粒子投与群において、有意な差は認められなかった。

(2) シリカナノ粒子胎仔期曝露により産仔の神経幹細胞に生じるマイクロ RNA 発現変動の網羅的解析

胎仔期にシリカナノ粒子あるいは溶媒の曝露を行ったマウス (新生仔) が 1 日齢になった時点で脳を採取し、神経幹細胞を単離した。これまでに、幹細胞マーカーである SOX2 が陽性となる割合が 90%以上の高い割合で神経幹細胞が得られている方法で単離した。得られた神経幹細胞から total RNA を抽

出・精製し、3D-Gene mouse miRNA oligo chip (東レ:プローブ数 1900) を用いて、シリカナノ粒子曝露によるマイクロ RNA の発現変動を網羅的に解析した。その結果、雄性産仔において 27 のマイクロ RNA の 1.5 倍以上への発現上昇 (表 1)、60 のマイクロ RNA に 0.67 倍以下への発現減少が認められた。また、雌性産仔において 1 のマイクロ RNA の 1.5 倍以上への発現上昇 (表 2)、303 のマイクロ RNA に 0.67 倍以下への発現減少が認められた。これらの発現変動が認められたマイクロ RNA のうち、1 つのマイクロ RNA は雌雄のいずれにおいても発現減少が認められ、シリカナノ粒子の生体影響に重要である可能性が考えられた。

表 1 雄性産仔において発現上昇が認められたマイクロ RNA

Name	Log2 Ratio (SiO ₂ NP/Vehicle)
mmu-miR-6969-5p	1.35
mmu-miR-5114	1.21
mmu-miR-758-5p	1.06
mmu-miR-30c-1-3p	0.95
mmu-miR-219a-2-3p	0.89
mmu-miR-210-3p	0.86
mmu-miR-192-5p	0.81
mmu-miR-6962-5p	0.81
mmu-miR-6352	0.79
mmu-miR-710	0.74
mmu-miR-8107	0.72
mmu-miR-5625-5p	0.69
mmu-miR-214-3p	0.66
mmu-miR-138-5p	0.65
mmu-miR-1946b	0.64
mmu-miR-7662-3p	0.64
mmu-miR-6404	0.63
mmu-miR-7053-5p	0.63
mmu-miR-129-5p	0.61
mmu-miR-7036a-5p	0.61
mmu-miR-6989-5p	0.60
mmu-miR-6991-5p	0.60
mmu-miR-6349	0.60
mmu-miR-6944-5p	0.59
mmu-miR-6952-3p	0.59
mmu-miR-667-5p	0.59
mmu-miR-7083-3p	0.58

表 2 雌性産仔において発現上昇が認められたマイクロ RNA

Name	Log2 Ratio (SiO ₂ NP/Vehicle)
mmu-miR-5129-5p	3.79

(3) シリカナノ粒子胎仔期曝露により発現変動するマイクロ RNA の機能に関する解析

マイクロアレイ解析において雌雄共通で発現減少が見られたマイクロ RNA に関して、まずその標的候補となる遺伝子 (mRNA) を推定した。マイクロ RNA の標的遺伝子を実験的に同定する手法は現時点では存在しないため、*in silico*での解析ツールを用いて推定を行った。推定原理が異なる3種類の解析ツール (TargetScan, microRNA.org, PITA) を用いてそれぞれ解析し、いずれのツールにおいても標的候補となる mRNA を抽出した。その結果、167 の mRNA が標的候補として見いだされた。

これらの mRNA により制御される生体機能について検討するため、その遺伝子機能を示す GO term を用いて機能グループ解析を行った。その結果、標的候補遺伝子が locomotory behavior、memory といった脳神経機能や postsynaptic density、nervous system development などの脳神経系の発生・発達に関する機能を示すカテゴリーに有意に濃縮されていることが示された (表3)。

以上より、シリカナノ粒子の胎仔期曝露が神経幹細胞において複数のマイクロ RNA の発現レベルの変動をもたらし、その結果、脳神経系の発生・発達やその機能獲得に関連する mRNA の発現レベルに影響を及ぼすことが示唆された。

表3 発現変動したマイクロ RNA の標的候補遺伝子の機能的分類

GO term	p-value	Enrichment Factor
locomotory behavior	<0.01	22.473
memory	<0.01	22.392
axon guidance	<0.01	18.177
postsynaptic membrane	<0.01	11.820
axon	<0.01	10.484
postsynaptic density	<0.01	10.090
neuronal cell body	<0.01	9.860
nervous system development	<0.01	9.657
neuron projection	<0.01	9.638
dendrite	<0.01	9.268
synapse	<0.01	8.255
cell differentiation	<0.01	5.516

(4) 今後の展望

神経幹細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能と自己複製能を有する細胞であり、中枢神経系の構築や機能維持に重要な役割を果たしている。発達過程の脳内では神経幹細胞が活発に分化・増殖を行うことで中枢神経系を構築している。そのため、神経幹細胞に生じる影響は胎児期における脳の正常な構築を妨げるとともに、出生後の産児の記憶学習能力の低下や神経変性疾患などにつながる事が報告されている。神経幹細胞の分化は細胞内在性プログラムであるマイクロ RNA の発現制御やエピジェネティクスと細胞外因子の協調作用によって厳密に制御されていることが知られている。特に、マイクロ RNA は組織特異的に発現するものが知られており、脳神経系においては神経幹細胞の増殖能・分化能の制御および神経系の正常な発達に極めて重要であると考えられる。

近年、PM_{2.5} などの浮遊粒子状物質のみならず、さまざまな産業や製品に用いられるナノ粒子の健康影響が懸念されているが、次世代への健康影響に関する報告は多くはなく、未解明な部分が多く残されている。本研究では、ナノ粒子のモデルとして用いられる粒子の1つであるシリカナノ粒子を用い、ナノ粒子が神経系に及ぼす影響について神経幹細胞に着目して検討を行った。得られた成果は、胎仔期に曝露されたナノ粒子が発達段階の仔の神経幹細胞におけるマイクロ RNA 発現の制御に影響を及ぼし、脳機能の正常な発達に影響を及ぼす可能性を示唆している。今後は、神経幹細胞に生じた miRNA の発現異常が一過性のものか、長期間にわたって持続するものか検討するとともに、成長後の脳機能にどのような影響を及ぼすか検討を行う必要があると考えられる。また、マイクロ RNA 発現変動がもたらされる分子メカニズムについて検討を行い、どのような性質を有するナノ粒子が生体影響を及ぼすのかを明らかとすることで、より安全なナノ粒子の開発に必要な情報が得られると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

梅澤雅和、立花 研、小野田淳人、武田健：大気中ナノ粒子の健康影響、環境技術(環境技術学会)、45(11): pp.11-16 (2016) (査読無)

[学会発表](計14件)

佐藤志穂、渡部容子、立花 研、浦丸直人、小島弘幸、吉成浩一、樋口敏幸、北村繁幸：

フタル酸エステル類とその代謝物が核内受容体 PXR および PPAR α の転写活性に及ぼす影響、日本薬学会第 138 年会、2018 年

村橋 毅、郭錦堂、樋口敏幸、立花 研、浦丸直人、小西瑞紀、上野華子、佐々木翔子、小山彰子：埼玉県と東京都における大気中の PM2.5 濃度、日本薬学会第 138 年会、2018 年

服部祥子、渡部容子、立花 研、小島弘幸、吉成浩一、北村繁幸：ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の PXR、CAR および PPAR α 活性とシトクロム P450 活性への影響、日本薬学会第 137 年会、2017 年

渡部容子、服部祥子、立花 研、佐能正剛、太田茂、北村繁幸：合成ムスク類のラット in vivo における肝シトクロム P450 活性への影響、日本薬学会第 137 年会、2017 年

広田あずさ、石山俊介、平沢百合、立花 研、高野文英、樋口敏幸：パルマチンは単球系 THP-1 細胞における LPS による Tissue factor 発現誘導を抑制する、日本薬学会第 137 年会、2017 年

立花 研、川副 翔太郎、梅澤雅和、武田健：二酸化チタンナノ粒子胎仔期曝露が脳の DNA メチル化レベル及び遺伝子発現に及ぼす影響、フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016 年

渡部容子、杉原数美、立花 研、佐能正剛、太田茂、北村繁幸：in vivo におけるラット肝シトクロム P450 活性に対するリン系難燃剤の影響、フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016 年

立花 研、黒岩法子、小島稔郁、湯浅珠恵、新海雄介、梅澤雅和、武田健：二酸化チタンナノ粒子妊娠期曝露により胎仔に生じるマイクロ RNA 発現変動の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年

須山史也、立花 研、小野田淳人、武田健、梅澤雅和：エクソソーム内包 microRNA の脳への送達、日本薬学会第 136 年会、2016 年

Ken Tachibana, Kohei Takayanagi, Ayame Akimoto, Kouji Ueda, Shotaro Kawazoe, Yusuke Shinkai, Masakazu Umezawa and Ken Takeda: Disruption of Epigenetic Regulation and the Health Effect Caused by Prenatal Nano-sized Particle Exposure. 4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2016 (iPoPS2016), 2016.

Fumiya Suyama, Ken Tachibana, Atsuto Onoda, Ken Takeda, Masakazu Umezawa: RT-PCR analysis of the distribution of exosomes with exogenous miRNA to the brain. 12th European Nutrition Conference (FENS), 2015.

立花 研、小番美鈴、川副翔太郎、上田剛司、新海雄介、梅澤雅和、武田健：二酸化チタンナノ粒子の胎仔期曝露により神経幹細胞に生じる遺伝子発現変動。フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年

Masakazu Umezawa, Fumiya Suyama, Ken Tachibana, Atsuto Onoda, Natsuko Kubota, Shinya Yanagita and Ken Takeda: Detection of inorganic nanoparticles and their potential targets in the brain of mice. 9th IBRO World Congress of Neuroscience (IRBO). 2015.

梅澤雅和、小野田淳人、川副翔太郎、立花 研、武田健：ナノ粒子曝露が脳の発達に及ぼす影響 - 鋭敏なマーカーと毒性学的意義、第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年

〔図書〕(計 1 件)

Ken Tachibana, Ken Takeda: DNA Methylation: Patterns, Functions and Roles in Disease (Nova Science Publishers, Inc.)、p1-28, (Total 213 pages), 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 研 (TACHIBANA, Ken)
日本薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：10400540

(2) 連携研究者

柳田 信也 (YANAGITA, Shinya)
東京理科大学・理工学部・講師
研究者番号：80471755