

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12342

研究課題名(和文) ナノ粒子曝露による慢性炎症がもたらす神経幹細胞のDNAメチル化異常と脳機能障害

研究課題名(英文) DNA methylation abnormality of neural stem cell and brain dysfunction caused by chronic inflammation which induced by nanoparticle exposure

研究代表者

立花 研 (Tachibana, Ken)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10400540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： ナノ粒子曝露による生体影響には、ナノ粒子が貪食細胞に取り込まれることで生じる慢性炎症が関わる考えられている。ナノ粒子胎仔期曝露が脳神経系に影響を及ぼすことが報告されているが、その発生メカニズムの解明のためには慢性炎症が神経幹細胞に及ぼす影響を解明することが重要である。本研究では、ミクログリア様細胞株MG5を用いて、シリカナノ粒子曝露により発現変動する炎症性サイトカインについて検討を行った。その結果、3日間にわたって複数の炎症性サイトカインの発現量が増加することを見出した。今後、これらの炎症性サイトカインが神経幹細胞のDNAメチル化に及ぼす影響を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ粒子は、その特有の性状から光触媒、化粧品、種々の工業製品、食品など様々な分野で利用されている。一方で、これらのナノ粒子の毒性については未解明の部分が残されている。我々は、これまでに様々なナノ粒子の妊娠期曝露が児の脳神経系の機能に影響を及ぼすことを明らかとしてきた。しかし、その健康影響の発生メカニズムはまだ不明な部分が多い。本研究はナノ粒子により生じる慢性炎症に着目し、ミクログリアにおいて発現量の増加する炎症性サイトカインについて検討したものである。本研究で見出された炎症性サイトカインについて、脳神経系に引き起こす健康影響を検討することでナノ粒子の毒性の回避につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： It has been indicated that chronic inflammation is associated with adverse effect of nanoparticle. We have been reported that prenatal exposure to nanoparticle affects the central nervous system. In order to clarify the mechanism of its adverse effects, it is important to elucidate the effects of chronic inflammation on neural stem cells. In this study, we investigated inflammatory cytokines whose expression was altered by exposure to silica nanoparticle on the microglia-like cell line MG5. We found several inflammatory cytokines that the expression levels were increased over 3 days. In the future, it is necessary to examine the effects of these inflammatory cytokines on DNA methylation in neural stem cells.

研究分野：環境衛生薬学

キーワード：ナノ粒子 DNAメチル化 エピジェネティクス 神経幹細胞 慢性炎症 胎児期曝露

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は粒径 1 ~ 100 nm 以下の超微小粒子であり、これまで用いられてきた一般的な大きさの物質とは異なる特有の物性を示す。この独特の性質が医薬品、食品、化粧品、光触媒など様々な用途に用いられ、新たな産業として大きく発展している。

一方で、ナノ粒子が発がん性、生殖毒性など生体に様々な健康影響を示すことが報告されている。ナノ粒子の実用化に伴い、ヒトがナノ粒子に曝露され健康を害される可能性が高まっている。また、大気中の微小粒子状物質である PM2.5 にも多量のナノ粒子が含まれることが明らかとなっており、大気を介したナノ粒子の曝露による健康影響も懸念される。

一般に、発生過程にある胎児は異物に対する防御機能が十分に発達していないため、成人に比べ障害が出やすく、ナノ粒子の曝露により大きな健康影響を受けると推測される。申請者らは、これまでに妊娠中の母体に曝露されたナノ粒子が胎児の脳に移行すること、発達後の脳において脳血管周囲細胞やアストロサイトの形態学的な異常や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障害が生じることを世界に先駆けて明らかとしてきた (Onoda ら PLoS One, 2014, Okada, Tachibana ら J Toxicol Sci, 2013)。ナノ粒子が引き起こすこれらの脳機能障害の予防法を確立する上で、障害発現メカニズムの解明が必須であるが、未だに十分には解明されておらず大きな課題となっている。

2. 研究の目的

ナノ粒子曝露による生体影響には、ナノ粒子が貪食細胞に取り込まれ、長期間にわたり体内に滞留することで生じる慢性炎症が関与することが示されている。しかし、ナノ粒子による慢性炎症と生体の機能障害をつなぐ分子メカニズムは解明されておらず、重要な課題である。特に、ナノ粒子胎仔期曝露による脳機能障害の発生メカニズムの解明には、慢性炎症が脳神経系発達の一環である神経幹細胞に及ぼす影響を解明することが必須である。

慢性炎症を生じた組織では DNA メチル化異常が蓄積されることが報告されている。DNA メチル化は組織や細胞にとって不要な遺伝子の発現を抑制するエピジェネティックな修飾であり、発生初期にすべて消去され、発生が進むにつれて再構築される。この再構築過程が個体の正常な発生・発達に必須である。このことから、ナノ粒子曝露による慢性炎症が神経幹細胞における DNA メチル化の再構築の過程に影響を及ぼし、分化・増殖に不可欠な遺伝子の発現が攪乱され、脳神経機能の獲得に異常が生じる可能性が高いと考えられる。

本研究では、申請者がこれまでに見出したナノ粒子胎仔期曝露による脳機能障害について、その発生メカニズムの検討を行った。脳内の貪食細胞であるミクログリアに着目し、ナノ粒子の曝露を行った際の炎症性サイトカインの変動について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の曝露および細胞毒性の検討

ナノ粒子は、毒性研究において標準的なナノ粒子として使用されているシリカナノ粒子 (Micromod : 粒径 100 nm) を用いた。マウスミクログリア様細胞株 MG5 細胞に対し、各種濃度で 3 日間処理した後、細胞毒性の有無について WST-1 試薬 (Dojindo) を用いて測定を行った。本研究では、細胞毒性の認められなかった最大濃度で細胞の処理を行うこととした。

(2) シリカナノ粒子曝露による炎症性サイトカイン mRNA の発現変動の検討

MG5 細胞に 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でシリカナノ粒子 (100 nm) を 3 日間処理し、経時的に細胞を回収した。回収した細胞から ISOGEN (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA 1 μg に対し、M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher) を用いて逆転写を行い、cDNA を得た。得られた cDNA に対して、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて定量的 RT-PCR を行い、各種炎症性サイトカイン mRNA の発現量を検討した。

(3) シリカナノ粒子曝露による炎症性サイトカインの培地中への放出量に関する検討

MG5 細胞に 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でシリカナノ粒子 (100 nm) を 3 日間処理し、培養後の培養上清を回収した。回収した培養上清を 4 で 15,000rpm、10 分間遠心分離して粒子を沈殿させ、上清を回収し、使用時までディープフリーザーで保存した。

得られた培養上清について、市販の ELISA キットを用いて炎症性サイトカインを定量した (マウス IL-1 およびマウス IL-1 : R&D systems、Prostaglandin E2・Leukotriene B4・Cysteinyl Leukotriene : Cayman)。

4. 研究成果

マウスミクログリア様細胞株 MG5 に対してシリカナノ粒子 (100 nm) を 3 日間曝露し、細胞毒性の有無について検討を行った。その結果、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで細胞毒性が見られなかったことから、本研究ではシリカナノ粒子の最大の曝露濃度を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とすることにした。

MG5 細胞に対して 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各濃度でシリカナノ粒子 (100 nm) を 3 日間曝露し、それぞれの細胞から total RNA を抽出した。得られた total RNA を用いて逆転写により cDNA を調製し、定量的 RT-PCR を用いて各種炎症性サイトカインの発現変動を調べた。その結果、処理 1 日後で IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6 に発現量の増加が認められた (図 1 A~C)。このうち、IL-1 β については 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曝露群で 3 日後においても発現量の増加が認められた (図 1A)。また、TNF の mRNA 発現についても 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曝露群で 3 日後において発現量の増加が認められた (図 1D)。

以上の結果から、シリカナノ粒子 (100 nm) の曝露により、IL-1 および TNF の持続的な発現増加が生じていると推測された。

また、これらの炎症性サイトカインおよび細胞の炎症性応答に關与するプロスタグランジンやロイコトリエンについて培養上清中への放出量の検討を行った。研究計画当初はマルチプレックスアッセイでの検討を計画していたが、現時点ではこれらの分子の検出に対応している検出系が存在していなかったことから、ELISA キットを用いて定量を試みた。しかし、ポジティブコントロールとして用いた LPS (リボポリサッカライド) や TNF の刺激でも定量限界以下の数値であり、定量ができなかった (データ未表示)。このことから、本研究で用いた MG5 細胞ではサイトカイン類の放出量が少ないことが考えられ、実験で用いる細胞密度を増やすなどの実験系の再検討が必要であると考えられた。

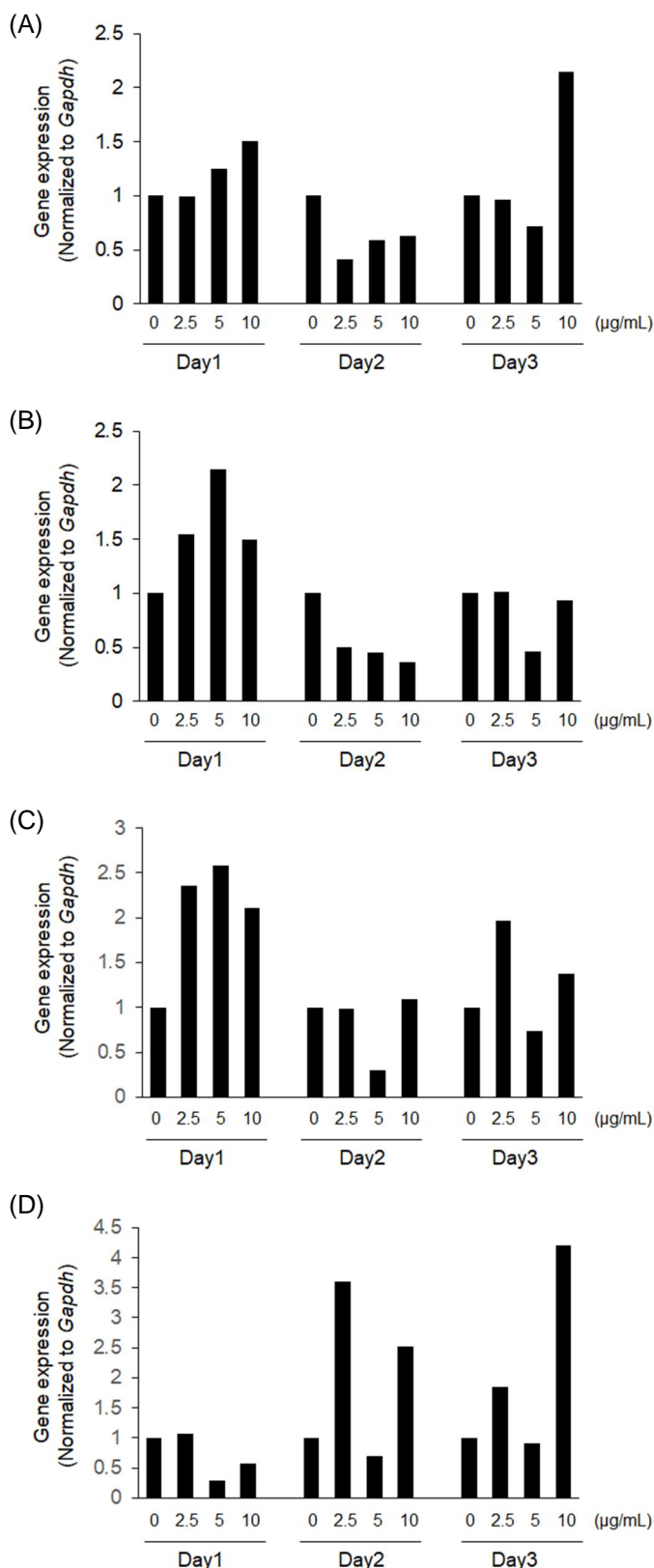


図 1 (右)
シリカナノ粒子曝露による MG5 細胞における炎症性サイトカイン mRNA の発現変動 (A: IL-1 β 、B: IL-1 α 、C: IL-6、D: TNF)

慢性炎症は様々な疾患の発症に関与していると考えられている。胃がんでは慢性炎症が DNA メチル化異常を引き起こすことで腫瘍の発症に関与する可能性が示されている。ナノ粒子の曝露でも、同様に慢性炎症が生じることで DNA メチル化異常が引き起こされる可能性が考えられる。DNA メチル化は個体の発生において各組織・細胞に必要な遺伝子の発現を制御している。このことから、脳神経系においては神経幹細胞からの各種細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。今後、本研究で発現変動が認められた炎症性サイトカイン類について、神経幹細胞の DNA メチル化に及ぼす影響を解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ken Tachibana	4. 巻 2022(1)
2. 論文標題 The long-term effects of exposure to nanoparticles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Access Government	6. 最初と最後の頁 214-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ken Tachibana, Shotaro Kawazoe, Atsuto Onoda, Masakazu Umezawa, Ken Takeda	4. 巻 3
2. 論文標題 Effects of Prenatal Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles on DNA Methylation and Gene Expression Profile in the Mouse Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Toxicology	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） 10.3389/ftox.2021.705910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ken Tachibana	4. 巻 2021(7)
2. 論文標題 How do environmental factors affect foetal development?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Access Government	6. 最初と最後の頁 244-245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ken Tachibana	4. 巻 2020(7)
2. 論文標題 Nanoparticles and their impact on DNA methylation -DNA Methylation Abnormality and Brain Dysfunction of Neural Stem Cells Caused by Chronic Inflammation by Nanoparticle Exposure-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 28-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2020.7.28	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野田淳人、梅澤雅和、立花 研、武田 健
2. 発表標題 超微小粒子の胎仔期曝露が誘導する仔の脳血管周辺異常とその機序
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2023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
研究協力者	柳田 信也 (Yanagita Shinya)		
研究協力者	梅澤 雅和 (Umezawa Masakazu)		

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
---------	---------