

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19409

研究課題名(和文) ナノ粒子による中枢神経系への影響解析に基づく、うつ病発症との関連解明

研究課題名(英文) Effects of nanoparticles on the central nervous system and the onset of depression

研究代表者

東阪 和馬 (Higashisaka, Kazuma)

大阪大学・高等共創研究院・准教授

研究者番号：20646757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノ粒子(人工微粒子)による神経細胞に対する生体応答、および、制御機構の解明を試みることで、外因性微粒子がうつ病をはじめとする精神疾患の発症・悪化におよぼす影響の一端を解明することを目的とした。その結果、モデル粒子として用いたナノ銀粒子が神経細胞の分化を抑制し得ることを見出し、それら発現メカニズムとして酸化ストレス応答が関与し得ることを明らかとした。今後、細胞内における活性酸素種を産生する部位であるミトコンドリアに着目し、神経機能の維持に重要なミトコンドリアの融合機能への影響について追究していくことで、ナノ銀粒子による神経分化抑制機序の解明を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患の発症・悪化には、各個人の複合的な原因のみならず、食事や喫煙に代表される生活習慣や化学物質曝露といった、自身と周囲の環境から生じる様々な環境要因が関与していることは言うまでもない。さらに、近年の疫学研究により、PM2.5といった環境中微粒子が脳・神経系にまで影響をおよぼす可能性が指摘されている。従って、本研究結果は、外因性微粒子への曝露という観点から、精神疾患の発症・悪化におよぼす影響の一端を明らかとした点で、外因性微粒子への曝露に起因した生体応答の理解に貢献すると共に、グローバルな健康環境の向上に寄与することが期待され、公衆衛生的視点からも意義深いものであると言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the biological responses of nanoparticles to nerve cells, and to elucidate a part of the effect of extrinsic fine particles on the onset and exacerbation of psychiatric disorders such as depression. As a result, silver nanoparticles used as model particles could suppress the differentiation of nerve cells, and the oxidative stress response might be involved as their mechanism. In the future, we attempted to investigate the effect on the fusion function of mitochondria, which is important for maintaining nerve function, and the following mechanism of silver nanoparticles-induced nerve differentiation suppression. We hope that this finding will help clarify the role of extrinsic fine particles in the onset and exacerbation of psychiatric disorders.

研究分野：ナノ安全科学、毒性学

キーワード：外因性微粒子 精神疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境中の天然に存在する微粒子への曝露による健康被害は古くから認知されており、現代社会においても大きな問題となっている。その点、近年の疫学研究により、外因性微粒子の吸入曝露が、脳神経系にまで影響をおよぼす可能性が指摘されている。例えば、外因性微粒子濃度の増加やその濃度が高い地域においては、大気中の微小粒子状物質に曝露したヒトの脳内において、微小粒子状物質の蓄積・凝集が認められたことや、PM2.5 の増加と不安障害への罹患に関わるオッズ比が有意に増加することが示されている。しかし、近年の脳機能解析研究により、うつ病をはじめとする精神疾患の病態解明が進展しつつあるものの、外因性微粒子をはじめとした環境因子が、こういった制御機構を介して、どのような分子病態を引き起こすのかについて、科学的に追究した事例は皆無に等しい。

このような背景のなかで、昨今では、製品応用を目的として工業的に生産された、人工微粒子であるナノ粒子の利用が増加し、我々は、既存の天然の微粒子のみならず、人工のナノ粒子にまで曝露される機会が急増している。従って、外因性微粒子への曝露という観点において、天然、あるいは人工の微粒子曝露とうつ病をはじめとする精神疾患の発症・悪化との因果関係の追究が求められているものの、その生体影響評価、および、制御機構の解明は進んでいない。その点で、研究代表者はこれまでに、ナノ粒子の物性-生体・細胞内動態-生体応答の体系的な連関追究を図り、ナノ粒子の生体応答解析、および曝露実態の解明に取り組んできた。この一連の研究の中で、(1)マウスへの経鼻曝露後、鼻腔から近い領域のみならず、遠い領域にまでナノ銀粒子が分布し得ること、また、(2) *in vitro* での検討において、神経細胞内に移行したナノ銀粒子が核・ミトコンドリア内に局在し得ることを明らかとしてきた。従って、ナノ粒子が直接的に脳に到達することで、脳神経系に対する生体応答を誘発する可能性を有することから、微粒子曝露に起因した精神疾患の発症・悪化との因果関係を明らかとするうえで、重要な知見になるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子(人工微粒子)の物性-生体内・細胞内動態-生体応答の体系的な連関追究を推進し、ナノ粒子による神経細胞に対する生体応答、および、制御機構の解明を試みることで、環境中に存在する外因性微粒子への曝露という観点から、外因性微粒子がうつ病をはじめとする精神疾患の発症・悪化におよぼす影響の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ナノ銀粒子

表面がクエン酸修飾された、粒子径 10 nm のナノ銀粒子 (nAg10) は nanoComposix より購入した。ナノ銀粒子分散液を培地で希釈する際には、凝集を防ぐため、BSA (Sigma-Aldrich) と等量混合した後に実験に供した。

培養細胞

ヒト由来神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) は ATCC より購入した。SH-SY5Y 細胞の維持培養には、56、30 分間の非働化処理を行った 10 % ウシ胎児血清 (Biosera) 1% 抗生物質 (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を含む DMEM/Ham's F-12 (Wako) を用い、37、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。

ナノ銀粒子によるレチノイン酸誘導性の神経分化への影響評価

神経分化への影響評価には、SH-SY5Y 細胞をプレートに播種し、終濃度 10 μM に調製したレチノイン酸 (Wako) および、nAg10 (2.5 μg/mL) を加え、6 日間培養した。神経突起の伸長は顕微鏡で観察、写真撮影後、ImageJ により定量的に解析した。脳由来神経栄養因子 (BDNF) および、ドパミンの産生量の解析には、SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸 (10 μM) および、ナノ銀粒子 (2.5 μg/mL) を加え、72 時間培養した。BDNF の発現量は real-time RT-PCR により、上清中ドパミン量は ELISA により解析した。酸化ストレス応答との連関解析には、レチノイン酸 (10 μM) nAg10 (2.5 μg/mL) に加え、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC, Sigma-Aldrich) を共処置し、BDNF の発現量を指標に解析した。

4. 研究成果

ナノ銀粒子が突起伸長におよぼす影響評価

本研究では、高い消臭・抗菌効果を有することから、衣類や消臭剤など生活に身近な物に使用されているナノ銀粒子を用いた。まず、SH-SY5Y 細胞に対し、レチノイン酸と nAg10、および nAg10 が極めてイオン化しやすいことから、対照群として銀イオンを処置した。なお、銀ナノ粒子の添加濃度は、細胞毒性の強い銀イオンが細胞障害性を示さない最大濃度である 2.5 μg/mL を基準として、各群の添加濃度を設定している。処置後、Real time RT-PCR、および ELISA を実施し、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現量と分泌量を評価した。なお、BDNF は神経回路の機能発

達に重要であり、神経分化の促進、神経突起の伸長やドパミン作動性神経細胞への分化を誘導することが報告されている。解析の結果、レチノイン酸による分化によって発現が上昇した BDNF は、銀処置によりその発現量、分泌量が減少することが明らかとなった。BDNF の減少から、神経突起の伸長に影響をおよぼすことが考えられたため、細胞形態を観察した。神経分化時には神経突起が伸長することから、神経分化における神経突起の長さは、分化の進行を判断する有効な指標とされている。そこで撮影した写真から、神経突起を認識し、長さを定量的に比較解析したところ、レチノイン酸単独群において伸長した神経突起は、銀処置によりその伸長が抑制されることが示された。

次に、BDNF の発現減少により、ドパミン作動性神経細胞への分化が抑制されている可能性を考え、ドパミンの分泌量、合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH)、トランスポーターであるドパミントランスポーター (DAT) の発現量を評価した。結果として、ドパミン分泌量が有意に減少すること、および、TH、DAT の発現量が減少する傾向が示された。これらのことから、nAg10 の処置により、ドパミン作動性神経細胞への分化が抑制されることが示唆された。ドパミン作動系の異常は神経発達障害の発症につながるということが報告されていることから、nAg10 がドパミン作動系に影響をおよぼすという本知見は、微粒子曝露に起因した精神疾患の発症・悪化との因果関係を明らかとするうえで、重要な知見になり得ると考えている。

nAg10 による神経分化抑制における酸化ストレスの関与

統合失調症や自閉症などの神経発達障害患者において、酸化ストレス応答の異常が認められることが知られている。加えて、酸化ストレス条件下において増加し、細胞に障害を与える活性酸素種 (ROS) は、神経細胞における BDNF の発現量を低下させ、情動認知機能異常を引き起こすことや、神経分化を阻害することが報告されている。以上のことから、nAg10 による神経分化の抑制に対する酸化ストレス応答の関与を追究するため、nAg10 による BDNF の発現減少と酸化ストレス応答との連関について評価した。まず、ROS 存在下において緑色の蛍光を発するプローブである CM-H₂DCFDA を供し、nAg10 曝露 24h、48h、72h 後の ROS 産生量を評価したところ、nAg10 曝露により経時的に ROS が増加することが示された。さらに、nAg10 による ROS の誘導が BDNF の発現減少におよぼす影響を評価するため、抗酸化剤であり、ROS の産生を抑制することが知られる NAC を用いて、nAg10 と NAC 共処置時における BDNF の発現変動を解析した。その結果、NAC 処置濃度依存的に、nAg10 による BDNF の発現減少が抑制されることが明らかとなった。従って、nAg10 が酸化ストレス経路を介して、BDNF の発現を抑制することが示唆された。

研究代表者のこれまでの検討において、神経細胞内に移行したナノ銀粒子が核・ミトコンドリア内に局在し得ること、また、細胞内において、ROS は、主にミトコンドリアから産生されることを踏まえると、nAg10 曝露によりミトコンドリア機能に影響をおよぼし得ることが考えられる。例えば、ミトコンドリアの融合機能は、異常を生じたミトコンドリアの機能を正常に戻すうえで重要であり、障害を生じると、呼吸不全や電子伝達系に異常をきたすことで、ATP 産生が抑制されたミトコンドリアでは ROS の産生が増加することが報告されている。実際に、神経機能の維持にもミトコンドリアの融合機能が重要な働きを示すことから、nAg10 曝露が、ミトコンドリアの電子伝達系や ATP 産生能、形態などにおよぼす影響を精査することで、nAg10 による神経分化抑制機序の解明につながるものと期待される。さらに今後、in vivo での神経分化・成熟、および、情動認知機能への影響評価を進めることで、外因性微粒子曝露と神経疾患の発症・悪化との連関について、重要な知見の提示に貢献できることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maki Ayaka, Lin Ying, Aoyama Michihiko, Sato Kenta, Gao Jian-Qing, Tsujino Hirofumi, Nagano Kazuya, Higashisaka Kazuma, Tsutsumi Yasuo	4. 巻 43
2. 論文標題 Silver Nanoparticles Induce DNA Hypomethylation through Proteasome-Mediated Degradation of DNA Methyltransferase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1924 ~ 1930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00631	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 該当する

1. 著者名 Ishizaka Takuya, Nagano Kazuya, Tasaki Ikkei, Tao Hong, Gao Jian-Qing, Harada Kazuo, Hirata Kazumasa, Saito Shigeru, Tsujino Hirofumi, Higashisaka Kazuma, Tsutsumi Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Optimization and Evaluation of Pretreatment Method for sp-ICP-MS to Reveal the Distribution of Silver Nanoparticles in the Body	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale Research Letters	6. 最初と最後の頁 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s11671-019-3016-9	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 東阪和馬, 笠原淳平, 櫻井美由紀, 豊田麻人, 衛藤舜一, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央
2. 発表標題 ナノ銀粒子による神経細胞でのアミロイド 発現増加とその誘導機序の解明に向けた検討
3. 学会等名 第47回日本毒性学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口慎太郎, 東阪和馬, 井阪 亮, 坂橋優治, 清本琴淑, 北原 剛, 泉谷里奈, 小林純大, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央
2. 発表標題 銀ナノ粒子が神経細胞の分化におよぼす影響評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井美由紀, 東阪和馬, 衛藤舜一, 越田 葵, 小椋万生, 仲本有里菜, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央
2. 発表標題 非晶質ナノシリカ曝露によるエンドサイトーシス障害の評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Higashisaka K.
2. 発表標題 Analysis of nanoparticles-induced biological effects for ensuring safety.
3. 学会等名 The 2nd World Summit on Toxicology and Applied Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東阪和馬
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
---------	---------