

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21727

研究課題名(和文)有害化学物質の曝露指標としてのmicroRNA

研究課題名(英文)microRNA as an indicator of exposure to toxic chemicals

研究代表者

大場 謙一(Ken-ichi, Ohba)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60256477

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 有害化学物質を扱う労働者の曝露指標として、尿及び血中エクソソームに含まれるmicroRNA(miRNA)がその指標として有用性があるかどうか調べるため、ラットにカドミウム(Cd)を経口投与し、投与期間は短期間と長期間の曝露を行った。Cd曝露後、尿及び血中エクソソームに含まれるmiRNAは380種類のプライマーを用いてreal-time PCR法で解析した。それぞれのエクソソームからCd短期及び長期曝露において増加または減少したmiRNAが検出できた。このように検出されたmiRNAは、Cdの影響を受けていることが予想されるため、Cdの曝露指標となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは、細胞から放出される膜小胞で、miRNAなどを含み、そのmiRNAは、標的とする遺伝子の発現を制御して、細胞増殖、アポトーシスなどのプロセスにおいて重要な働きをする。本研究はCd曝露により細胞が障害を受け、その細胞からCd曝露に特異的なmiRNAを含むエクソソームが分泌されると予想し研究を行った。このようなmiRNAが特定されると、Cdの曝露指標になると考えた。さらにCd以外の重金属や有機溶剤等の曝露指標としてもmiRNAは利用することができ、様々な有害化学物質を用いて作業する労働者の健康障害の予防として利用価値が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文): To investigate the usefulness of microRNAs (miRNAs) in urine and blood exosomes as indicators of exposure of workers handling hazardous chemicals, rats were orally administered cadmium (Cd), with short- and long-term exposure. The miRNAs in urine and blood exosomes were analyzed by real-time PCR using 380 primers. Increased or decreased miRNAs were detected in urine and blood exosome during Cd short- and long-term exposure. The detected miRNAs were expected to be affected by Cd and could be used as an indicator of Cd exposure.

研究分野：分子疫学

キーワード：microRNA カドミウム エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の発展に伴い、これからの労働者の健康診断において遺伝子検査が行われる可能性が高いと考えられる。そこで、有害化学物質の曝露指標として、遺伝子DNAのメチル化が利用可能かどうかを検討した。DNAのメチル化は一度メチル化されるとメチル化酵素によりDNAの複製後もそのメチル化が維持されるため、化学物質による遺伝子DNAのメチル化は、その曝露指標として有用であると考えた。挑戦的萌芽研究（平成23年度～平成24年度）「有害化学物質の曝露評価としての遺伝子検査（課題番号：23659357）」において、メチル化DNAは有害化学物質の曝露指標として有用であるか検討した。組織中のメチル化DNAを網羅的に調べるため、散在性反復配列を標的遺伝子（ID、Aluなど）とした。重金属カドミウム（Cd）をラットに長期間経口投与し、肝臓由来の遺伝子DNAのID配列のメチル化を検出した。メチル化感受性制限酵素を用いた方法で解析した結果、CdによりDNAメチル化の割合が高くなった。

次に有害化学物質の曝露指標としてのRNAは、DNAと比べ分解されやすいため、健康診断の評価に利用する試料として向かないと考えていた。細胞質内にはRNAを分解する酵素が存在するため、試料の採取後冷却し、すぐにRNAを抽出してcDNAに合成しなければ、労働時のRNAの発現量を正確に測ることができない。また、抽出したRNAをすぐに使用しない場合、-80度に保存しなければならない。

最近、細胞から分泌されるエクソソームについての研究が進み、血液や尿等に存在し、細胞間の情報伝達として利用されていることが報告されている。このエクソソームは脂質二重層の小胞で、miRNA等の核酸や蛋白質、脂質等が含まれている。その中に存在するRNAは、細胞外に存在する時と比べて、RNAは分解されにくいと考えられる。このようなmiRNAは健康診断の試料として有用であると考えられる。

また、エクソソームは疾患と関連する報告があり、特に癌の領域で多くの研究がなされ、癌細胞から分泌されるエクソソームに転移に関与するmiRNA等が含まれることが報告されている。この様な知見から、有害化学物質に曝露されると、曝露された細胞から特異的なmiRNAを含むエクソソームが分泌されると予想し、このようなmiRNAは有害化学物質の曝露指標として利用可能と考えられる。

2. 研究の目的

有害物質を取り扱う労働者の健康障害の防止として、一般健康診断や特殊健康診断による健康管理が行われている。特に特殊健康診断では、有害物質の曝露指標として、尿や血液試料から有害物質そのものや、その代謝物、または有害物質によって影響される生体指標（代謝酵素等）を調べて、健康への影響を評価し、労働者の健康障害の予防に役立たせている。

本研究は、有害化学物質を扱う労働者の曝露指標として、尿及び血液中のエクソソームに含まれる核酸（microRNA；miRNA）がその指標として利用可能かどうかを調べるため、その第一歩として実験動物（ラット）に有害物質（Cd）を投与し、その曝露された動物の尿及び血液試料中からエクソソームを回収・精製し、そのエクソソームに含まれるmiRNAを分析する。対照として水を投与した群と比較して、有害物質に特異的なmiRNAを検出する。また、化学物質の短期及び長期曝露を行い、曝露の方法の違いによるmiRNAの発現も調べる。

3. 研究の方法

ラットのCd曝露はCd投与液を経口的に行い、投与期間は短期間と長期間の曝露を行った。

3-1 Cd 短期曝露

Wistar系雄ラット（6週令）に胃カニューレを用いて、Cd投与液（CdCl₂）を5mg Cd/kg（20mg Cd/kg：血清試料用いた実験時の投与量）、経口投与し（曝露群）、代謝系ケージに移した。対照として蒸留水を経口投与した（対照群）。投与24時間後、24時間採取した尿を回収した。次にイソフルランで吸入麻酔後、心臓から全採血して血液を採取した。血液試料は、血清または血漿に分離した。

試料中のCd濃度は、尿及び血液試料を灰化後、原子吸光光度計で測定した。

尿及び血漿または血清のエクソソームは、エクソソーム回収試薬（それぞれExoQuick-TC（尿用）、ExoQuick ULTRA（血液用）〔System Biosciences (SBI)社〕）を用いて精製した。精製したエクソソームは、キット（SeraMir Exosome RNA Amplification Kit〔SBI社〕）を用いて、エクソソームからRNAを抽出した。

抽出したRNAはcDNAに合成し、380種類のmiRNAを増幅するプライマー（Exosome RNA 384 microRNA qPCR Profiler Assay Set〔SBI社〕）を用いて、real-time PCR法で尿及び血漿エクソソームに含まれるmiRNAの発現を調べ、さらに対照と比較しCdによるmiRNAの発現を調べた。

3-2 Cd 長期曝露

ラットにCd投与液を0, 1, 2, 5 mg Cd/kg/day, 週5日, 約1ヶ月間経口投与した。0, 1, 2, 5 mg Cd/kg/day 投与群をそれぞれ0mg群, 1mg群, 2mg群, 5mg群とした。

解剖前日に代謝ケージに移し, 24時間尿を採取した。解剖はソムノペンチルで吸入麻酔後, 心臓から全採血して血液を採取した。血液試料は, 血清に分離した。

エクソソーム回収・精製, cDNA合成及びreal-time PCR法はCd短期曝露と同様の方法で行った。尿及び血清エクソソームに含まれるmiRNAの発現は, 0mg群と5mg群の試料を用いた。

4. 研究成果

4-1a Cd 短期曝露による尿及び血液中のCd濃度

尿及び血液中のCd濃度はCd投与により, それぞれ増加した(図1)。

4-1b Cd 短期曝露における尿及び血漿中エクソソームに含まれるmiRNAの発現

Cd短期曝露において, 尿及び血漿中エクソソームではそれぞれ276, 250種のmiRNAが検出された。Cd短期曝露により増加したmiRNAは尿及び血漿試料においてそれぞれ51, 91種, 減少したものはそれぞれ81, 64種であった。

4-1c Cd 短期曝露によるmiRNAの発現

Cdを20mg Cd/kg投与した群において, 尿中エクソソームから検出された4種のmiRNA (rno-miR-10b-5p, rno-miR-19b-3p, rno-miR-93b-5p, rno-miR-206-3p)はCd投与により減少した(図2)。また, 血清中エクソソームから検出された5種のmiRNA (rno-miR-99a-5p, rno-miR-100-5p, rno-miR-134-5p, rno-miR-199a-5p, rno-miR-323-5p)のうちrno-miR-323-5pを除き, Cd投与により減少し, rno-miR-323-5pは増加した(図3)。

4-2a Cd 長期曝露における尿及び血液中のCd濃度

尿及び血液中のCd濃度はCd投与量に応じて増加した(図4)。

4-2b Cd 長期曝露における尿及び血清中エクソソームに含まれるmiRNAの発現

Cd長期曝露において, 尿及び血清中エクソソームではそれぞれ226, 235種のmiRNAが検出された。Cd長期曝露により増加したmiRNAは尿及び血清試料においてそれぞれ85, 87種, 減少したものはそれぞれ77, 61種であった。

4-2c Cd 長期曝露によるmiRNAの発現

尿エクソソームから検出されたrno-miR-196a-5pはCd投与量に応じて増加し, rno-miR-196a-5pはCd投与量に応じて減少する傾向が見られた(図5)。

4-3 Cd 短期及び長期曝露における尿及び血漿中エクソソームに含まれるmiRNAの発現

Cd短期及び長期曝露において, 尿中エクソソームではCd曝露により増加したmiRNAは24種, 減少したものは14種であった。また, 血漿中エクソソームでは増加したmiRNAは11種, 減少したものは16種であった。

4-4 このようにCdの短期間及び長期間の曝露により, 増減するmiRNAが検出されたため, これらのmiRNAは, Cdの曝露指標となることが予想された。また, 尿中エクソソームからmiRNAを検出できたことにより, miRNAの安定性の確保及び非侵襲的に試料を採取できるため, 特殊健康診断の新たな指標になり得ると考えられた。

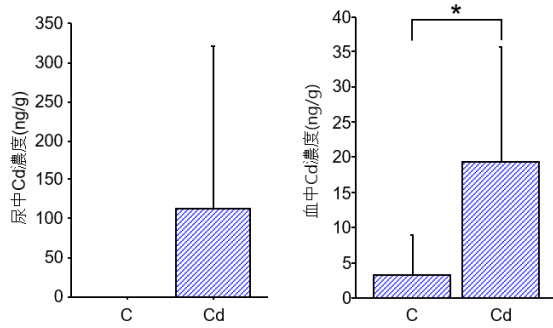


図1 Cd短期曝露における尿及び血中Cd濃度

C: 対照群, Cd: Cd曝露群, *: $p < 0.05$

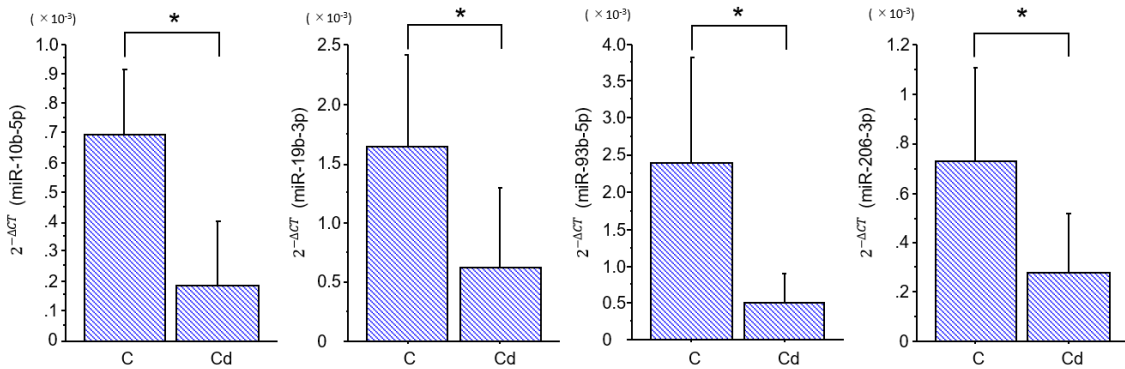


図2 Cd短期曝露による尿エクソソーム中の各miRNAの発現

C: 対照群, Cd: Cd曝露群, *: $p < 0.05$

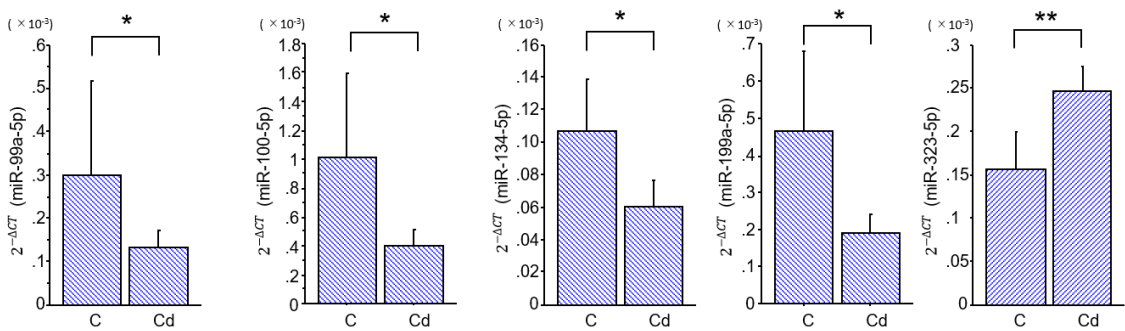


図3 Cd短期曝露による血清エクソソーム中の各miRNAの発現

C: 対照群, Cd: Cd曝露群, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

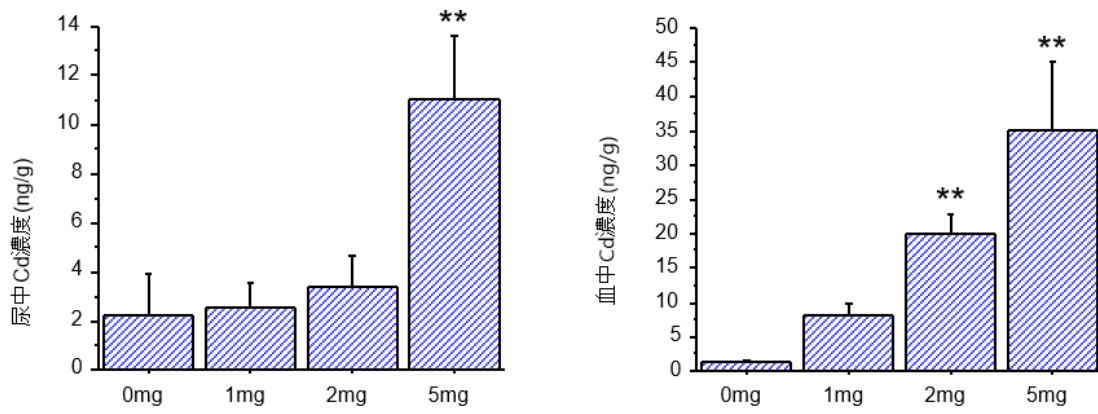


図4 Cd長期曝露における尿及び血中Cd濃度

** : $p < 0.01$ vs 0mg

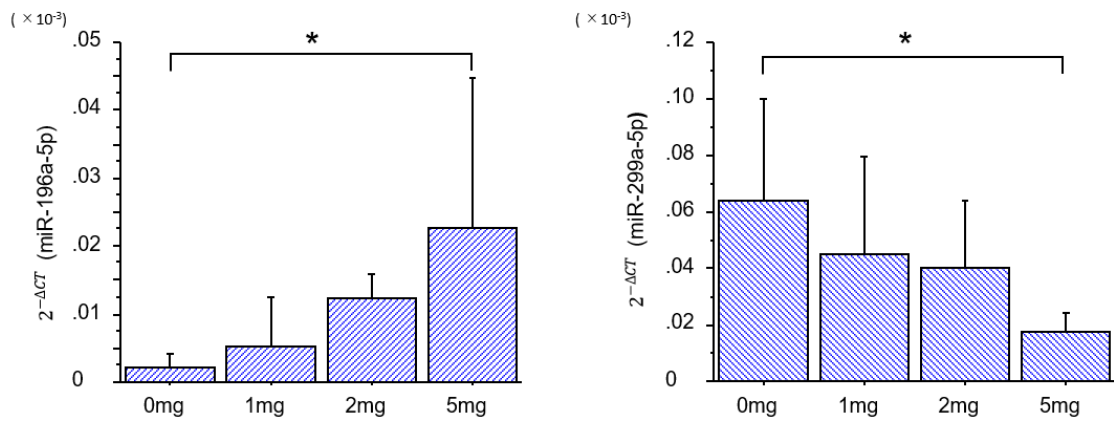


図5 Cd長期曝露による尿エクソソーム中の各miRNAの発現

* : $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Kawakami Fumitaka, Imai Motoki, Tamaki Shun, Ohta Etsuro, Kawashima Rei, Maekawa Tatsunori, Kurosaki Yoshifumi, Ohba Kenichi, Ichikawa Takafumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Nrf2 Expression Is Decreased in LRRK2 Transgenic Mouse Brain and LRRK2 Overexpressing SH-SY5Y Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 123 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00356	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大場謙一
2. 発表標題 カドミウム曝露の影響指標としてのmiRNA
3. 学会等名 第96回日本産業衛生学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川上文貴, 今井基貴, 玉木俊, 川島麗, 前川達則, 大場謙一, 市川 尊文
2. 発表標題 パーキンソン病原因分子LRRK2によるRab-GLUT4経路を介した脂肪細胞における糖取り込み制御
3. 学会等名 第143年会日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大場謙一
2. 発表標題 カドミウムの影響指標としての尿中メタロチオネインmRNA
3. 学会等名 カドミウムの影響指標としての尿中メタロチオネインmRNA
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上文貴, 石川勇太, 玉木俊, 川島麗, 前川達則, 大場謙一, 市川尊文
2. 発表標題 DSS腸炎モデルマウスを用いたIBD疾患感受性遺伝子LRRK2の腸炎における役割解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
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
---------	---------