

【研究課題名】

化学物質曝露によるミクログリアーニューロン間のシグナル攪乱に関する新規バイオマーカーの探索

【研究代表者名】

平野 哲史(富山大学 学術研究部 薬学・和漢系)

【共同研究者名】

野見山 桂(愛媛大学 沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門)

【研究目的】

我々が無自覚に曝露されている化学物質の一部は、脳内の受容体に作用することで細胞内外における情報伝達を攪乱するシグナル毒性を示す。とくにミクログリアの活性化により生じる慢性的な炎症応答がニューロンにおけるシナプス機能不全や異常タンパク質の蓄積の原因となるという「神経炎症仮説」は、種々の神経疾患の発症要因として注目を集めている。一方で、げっ歯類の病理的解剖や肉眼行動観察を指標とする従来神経毒性試験では、化学物質の神経毒性を細胞死の前段階で捉えることができない点が未解決課題として指摘されている。

そこで本研究では、まず、ミクログリアの活性化等を指標とした *in vitro* スクリーニング系を新規に構築し、多数の化学物質の中から「神経炎症の惹起」のリスクを有する化学物質を同定する。さらに、ミクログリアーニューロン間のシグナル攪乱を新たな神経毒性の上流イベントとして影響メカニズムの解析を行い、化学物質曝露による神経炎症惹起に関する新規バイオマーカーの開発に応用することを目指す。

【研究方法】

細胞培養と化学物質処理

ヒト不死化ミクログリアである HMC-3 は 10%FBS 添加 E-MEM 培地を用いて培養した。ヒト不死化ドーパミン作動性ニューロンである LUHMES は既報に従って、Advanced DMEM/F12 培地に 2 mM GlutaMAX、1% N2 supplement、40 ng/mL

bFGF を添加した growth medium 中で培養し、分化誘導時には、Advanced DMEM/F12 培地に 2 mM GlutaMAX、1% N2 supplement、1 mM Dibutyl cAMP、2 µg/mL tetracycline、2 ng/mL human GDNF を添加した differentiation medium を用いた。農薬類等の化学物質は DMSO に溶解させ stock solution を作製した。HMC-3 の播種後 24 時間後に FBS 不含 E-MEM 培地への交換を行い、DMSO 終濃度が 0.1% となるよう各 stock solution を培地中に直接添加することで各化学物質を曝露した。

qRT-PCR

HMC-3 への化学物質の曝露 24 時間後に、NucleoSpin RNA plus を用いて total RNA を精製した。Nanodrop を用いた吸光度測定により RNA 濃度を測定し、それぞれ 250 ng の RNA を PrimeScript RT reagent Kit により逆転写することで鋳型 cDNA を合成した。特異的プライマーと THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix を混合し、StepOnePlus を用いて 95°C 30 秒の初期変性、95°C 5 秒、60°C 30 秒の PCR 反応を 40 サイクル行い、検量線法により各 mRNA のコピー数を相対定量した。

Co-culture モデルの作製

LUHMES (1.0×10^6 cells) を 6 cm ディッシュに播種し、24 時間後に differentiation medium に交換して 48 時間培養することで、分化誘導を行った。その後、分化誘導後の LUHMES (5.0×10^4 cells) を 24 well プレートに播種した。また、HMC3 (1.0×10^4 cells) を別の 24 well プレート内で Culture insert 上に播種した。両細胞の播種 24 時間後に、分化 LUHMES を培養中の 24 well プレート内に Culture insert を移すことで Co-culture モデルを作製し、化学物質を曝露した。24 時間培養後に Culture insert を取り除き、培養液中に Calcein ($1 \mu\text{M}$) および H33342 ($1 \mu\text{g/mL}$) を添加することで LUHMES の細胞質および核を蛍光標識した後、イメージングサイトメーターにより画像を取得し、神経突起面積を定量した。

エクソソームの精製

HMC-3 (3.0×10^6 cells) を 15 cm ディッシュに播種し、24 時間後に FBS 不含 Advanced DMEM/F12 培地への交換を行った。さらに 48 時間後に回収した培養上清を 2,000 g で 5 分間遠心した後、上清を回収することでデブリや死細胞を除

去した。さらにメンブレンフィルターによる濾過を行い、0.22 μm 以下の夾雑物を除いた後、超遠心機 Optima L-70 およびスイングローターSW-28 を用いて、28,000 rpm (100,000 g)、100 分間の超遠心を行い、上清を廃棄した。その後 PBS を加えて再度同条件で超遠心を行うことでエクソソームペレットを得た。エクソソームペレットを PBS に再度溶解し、LUHMES に添加することで機能解析を行った。

ウェスタンブロッティング

超遠心法により得られたエクソソームペレットに RIPA buffer を添加し、microBCA アッセイにより得られたサンプルのタンパク質濃度を測定した。等量のタンパク質サンプルに SDS sample buffer を加え、94°C 5 分間の熱処理を行った。SDS-PAGE により分離した後、PVDF メンブレンに転写し、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、抗 CD9、CD63 抗体 (Fujifilm wako #014-27763; 012-27063、各 1: 6,000) と 4°C で 18 時間反応させ、二次抗体となる HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling #7076、1: 10,000) と室温で 1 時間反応させた。イムノスターLD を発光基質として添加し、バンドの発光シグナルは ChemiDoc Touch MP により取得した。

【研究成果】

ヒト不死化ミクログリアである HMC-3 に農薬等の化学物質を曝露し、qRT-PCR 法により炎症性因子 (IL-6 等) の遺伝子発現変化を測定することでミクログリアの活性に及ぼす影響を評価した結果、フェニルピラゾール系農薬の 1 種であるフィプロニル (Fip) は濃度依存的な生存性の低下 (図 1A) および IL-6 発現の上昇 (図 1B) を引き起こし、体内主要代謝物であるフィプロニルスルホン (FipS) ではそれらの作用がさらに大きくなることを見出した。

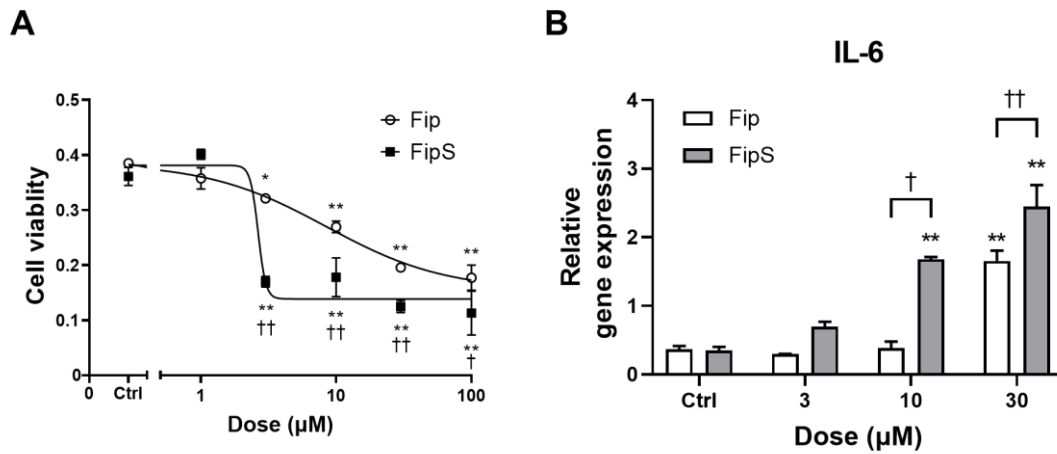


図 1. フェニルピラゾール系農薬フィプロニル(Fip) および主要代謝物フィプロニルスルホン(FipS)が HMC3 の(A)細胞生存性および(B) IL-6 の遺伝子発現量に及ぼす影響

さらに、ヒト不死化ドーパミン作動性ニューロンである LUHMES の単独培養および HMC-3 の共培養モデルに FipS を曝露し、FipS によるミクログリアの活性化が神経細胞の突起伸長に及ぼす影響を細胞間相互作用に着目して評価した。その結果、単独培養の LUHMES における FipS 曝露は 10 µM 以上の濃度において神経突起伸長を抑制したが、共培養においては 10 µM の FipS 曝露による LUHMES の神経突起伸長の抑制作用が軽減する、すなわち FipS により活性化したミクログリアはニューロンへの神経毒性に対して保護的に働くことが明らかになった(図 2)。

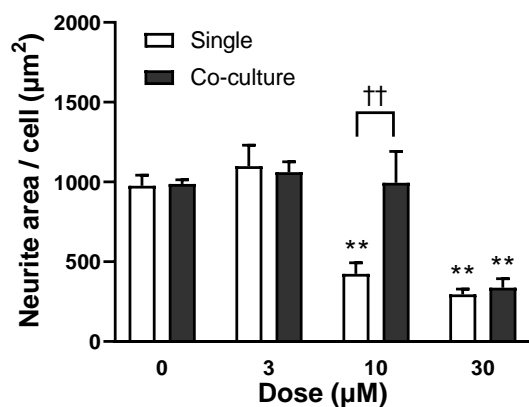


図 2. 単独培養および HMC3 と共培養した LUHMES の神経突起伸長にフィプロニルスルホン(FipS)が及ぼす影響

次に、末梢における新規バイオマーカーの候補として着目されているエクソソームに着目した解析を行うため、ミクログリアが培養上清中に放出したエクソソームの回収及び精製方法について、超遠心法の最適化を検討し、その性状および機能に関する解析を行った。超遠心法で回収したエクソソームは典型的なエクソソームマーカーであるテトラスパニンファミリーCD9 および CD63 の陽性を示したことから、本回収法によりミクログリア由来のエクソソームが回収可能であることが確認できた(図 3A)。各マーカーの発現量に FipS 10 μ M 曝露による影響は見られなかった一方で、FipS 10 μ M 曝露群のエクソソームを LUHMES に曝露すると対照群と比較して神経突起長が増加した(図 3B)。

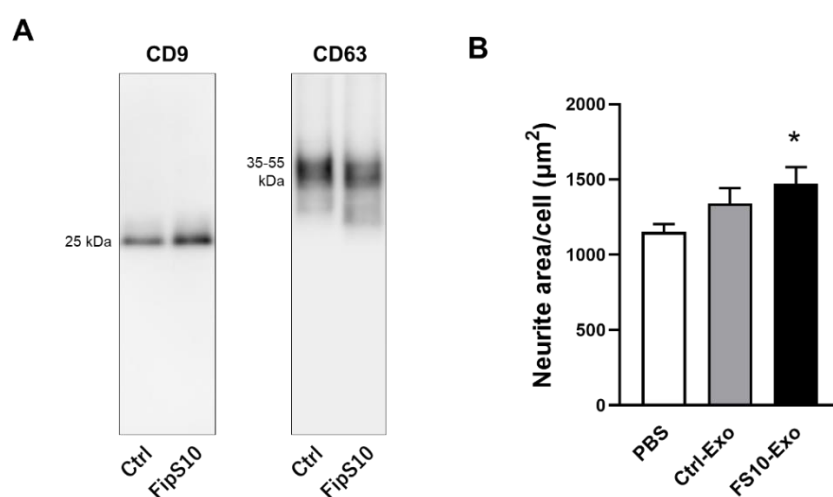


図 3.超遠心法により回収したミクログリア由来エクソソームの(A)性状、および(B) LUHMES の神経突起伸長に及ぼす影響

【今後の課題】

本共同研究により、フェニルピラゾール系農薬のフィプロニル(Fip) およびその代謝物であるフィプロニルスルホン(FipS)がミクログリアの活性化を引き起こすことを初めて明らかにした。さらに神経細胞との共培養モデルを用いた実験から、エクソソームを介した相互作用の存在が示唆された。今後は、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析により、ミクログリア由来エクソソーム中に含まれる代謝産物や microRNA に関する網羅的解析を行うことで、ミクログリアーニューロン間における細胞間相互作用に化学物質が及ぼす影響に関する詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。