

## 【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の神経毒性試験では、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。

申請者らは昨年度の本共同研究により、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。そこで本研究では、ミクログリアのミトコンドリア機能等に関する解析やミクログリア由来エクソソーム中に含まれる 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の攪乱に関する新たなメカニズムの解明と新規バイオマーカーを検討することを目的とした。

## 【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。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。

### ミトコンドリア膜電位の測定

HMC-3 ( $2.0 \times 10^4$  cells) を 96 well plate 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。さらに化学物質曝露の 24 時間後に FluoroBrite DMEM で希釈した JC-10 (15  $\mu$ M) を 100  $\mu$ L 加え、30 分インキュベートした。それぞれ 490/525 nm、540/590 nm における蛍光強度を SpectraMax i3 により測定した。

### エクソソームの精製

HMC-3 ( $3.0 \times 10^6$  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。さらに化学物質曝露の 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  $\mu$ m 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分離を行うことでエクソソームペレットを回収した。

### Small RNA-seq 解析

回収したエクソソームペレットから NucleoSpin miRNA を用いて micro RNA を精製した。Bioanalyzer 2100 と RNA 6000 pico kit を用いて、そのサイズ分布、クオリティ、濃度を確認した。Small RNA-seq は AZENTA 社に委託し、Novaseq により 1x50bp single-read を 1000 万リード以上取得した。各リードデータはアダプター配列の除去およびクオリティチェックを行った後、既知のヒトファレンスゲノムである GRCh38.p14 を用いてアライメントし、miRbase を用いてアノテーション情報を付与した。FipS 曝露群において、対照群と比較して 2 倍以上発現変動した

microRNA を抽出した。さらに Ingenuity Pathway Analyses ソフトウェアの microRNA target filter を用いて、発現変動した microRNA の標的となる mRNA を同定し、それらを用いた機能的ネットワーク解析を行った。

### 【研究成果】

ヒト不死化ミクログリア細胞株である HMC-3 に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) および体内主要代謝物であるフィプロニルスルホン (FipS) を 24 時間曝露し、JC-10 の蛍光強度比からミトコンドリア膜電位を測定した結果、Fip では 100  $\mu\text{M}$  以上、FipS では 1  $\mu\text{M}$  以上の濃度においてミトコンドリア膜電位の有意な低下がみられた。以上より、Fip の体内代謝物である FipS はミクログリアのミトコンドリアに対してより高い毒性を示すことが明らかとなった (図 1)。

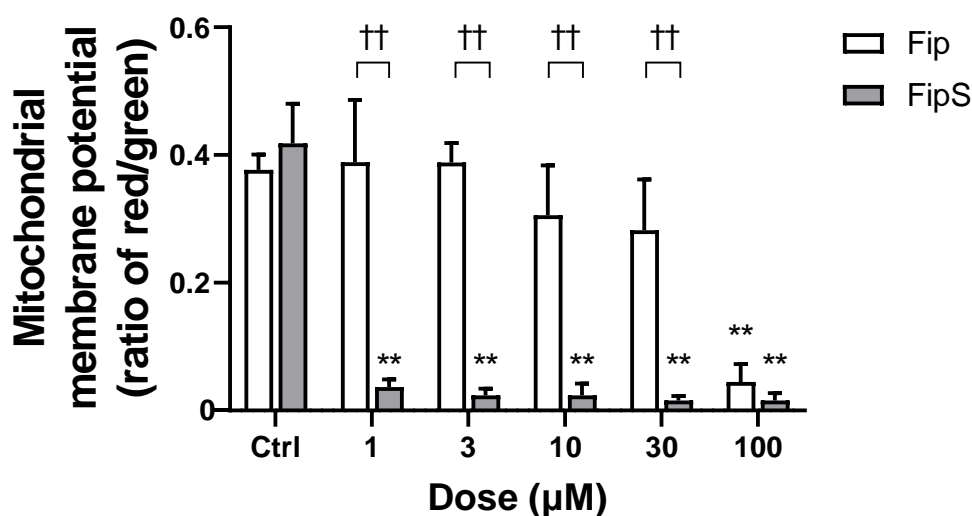


図 1. フェニルピラゾール系農薬フィプロニル (Fip) および主要代謝物フィプロニルスルホン (FipS) が HMC3 のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響

次に、昨年度の共同研究により最適化済みの超遠心法によりミクログリア由来エクソソームを回収し、エクソソーム中に含まれる microRNA の精製を試みた。Bioanalyzer により得られたサンプルのサイズ分布、クオリティ等を評価した結果、典型的な microRNA のサイズを示す 25-200 nt の波形が存在することから、本手法によりエクソソーム由来 microRNA を回収可能であることを確認した (図 2)。

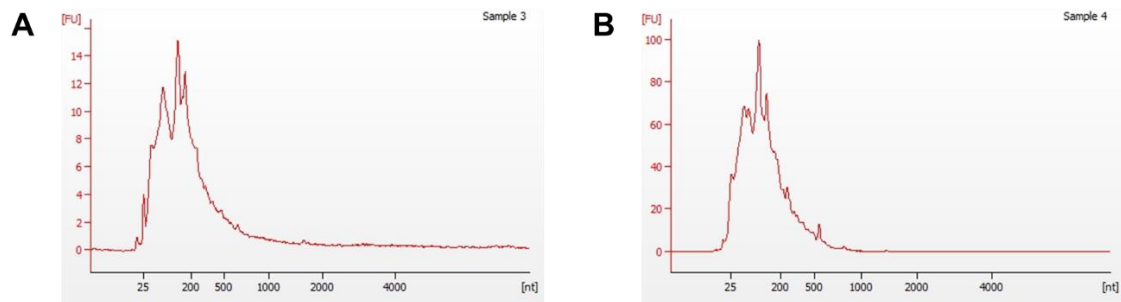


図 2. (A) 対照群および(B) FipS 曝露群のミクログリア由来エクソソームより精製した microRNA の electropherogram

続いて、small RNA-seq 解析によりエクソソーム中に含まれる microRNA の網羅的発現解析を行い、FipS 10  $\mu$ M の曝露により 2 倍以上発現上昇した microRNA 29 種、発現低下した microRNA 43 種を同定した。Ingenuity Pathway Analyses ソフトウェアの microRNA target filter を用いて、これらの microRNA の標的として予測される mRNA のうち、「Axonal Guidance Signaling」のパスウェイに関するものを抜粋し、機能的ネットワークを作製した(図 3)。

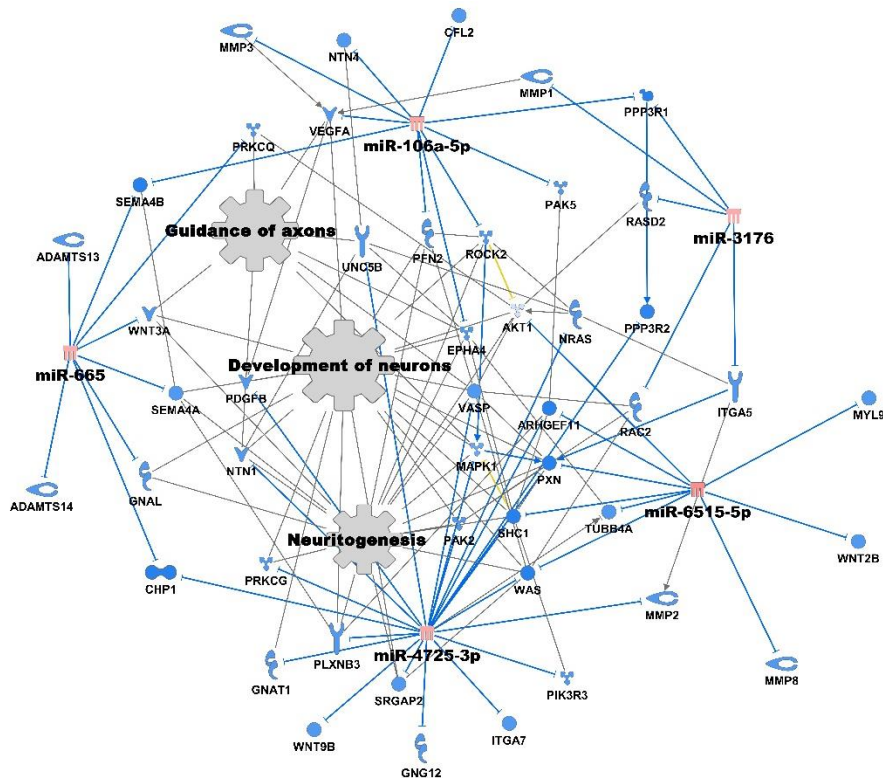


図 3. FipS 10  $\mu$ M の曝露により発現上昇した microRNA (赤色) とそれらの標的として発現低下が予想される mRNA (青色) により構成された神経機能に関する機能的ネットワーク

### 【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) がミクログリアに及ぼす影響メカニズムとして、FipS が Fip に比べてミトコンドリア膜電位をより低下させることを明らかにした。また、ミクログリア由来エクソソーム中に含まれる microRNA とその標的となる mRNA を同定し、昨年度報告した神経保護的作用に関する統合的ネットワークを明らかにした。今後は、メタボローム解析によりミクログリア中に含まれる代謝産物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さらなるメカニズムを明らかにする。