

【研究課題名】

メタボローム解析を用いた化学物質曝露によるシグナル毒性に関する代謝物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1種であるフィプロニルがミクログリアの活性化を引き起こし、エクソソーム分泌を介したミクログリアーニューロン間の相互作用を攪乱するという新たな所見を得た。そこで本研究では、化学物質曝露時のミクログリアおよびニューロンの細胞内の初期応答に関する影響メカニズムを明らかにし、網羅的メタボローム手法により化学物質曝露による「シグナル毒性」に関する代謝物バイオマーカーの開発に応用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。

ウェスタンブロッティングによるオートファジー活性の測定

化学物質処理 24 時間後の HMC3 細胞を氷冷した RIPA 緩衝液[150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウムおよび 0.1% プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク、京都、日本)を添加した 1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)]を加え、超音波破砕機でホモジナイズした後、14,000 g で 5 分間遠心した。上清を回収し、Pierce BCA または micro BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)を用いて総タンパク質濃度を測定した。各サンプルから等量の細胞溶解液を SDS サンプルバッファー[最終濃度 50mM Tris-HCl バッファー (pH6.8)、10%グリセロール、2%SDS、5%メルカプトエタノール、0.025%ブロモフェノールブルー]中で 94℃、5 分間煮沸し、SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離し、PVDF 膜に転写した。メンブレンを PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal(東洋紡、大阪、日本)を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、抗 LC3 ウサギ抗体 (1:2000、#3868; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗 p62 ウサギ抗体 (1:4000、#PM045; MBL International Co.)、抗 GAPDH マウス抗体 (1:10000、#60004-1-Ig; Proteintech)、を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1(東洋紡)に溶解し、4℃で一晩静置した。0.1%Tween20 を含むトリス緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した後、メンブレンを StarBright Blue 700 ヤギ抗ウサギ IgG (1:4000、#12004161、Bio-rad)と IRDye 800CW ヤギ抗マウス IgG (1: 4000, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA)、または HRP 標識抗マウス IgG (1:10,000、#7076; Cell Signaling Technology)を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2(東洋紡)にて室温で 1 時間処理した。膜上のバンド強度は、Immunostar LD 化学発光検出試薬(富士フ

イルム和光純薬)と ChemiDoc Touch MP Imaging system および Image Lab 6.0.1 ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて定量した。

細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリアの測定

化学物質曝露後の細胞内酸素消費率 (OCR) および細胞外酸性化率 (ECAR) は、Cell Mito Stress Test kit (Agilent Technologies/Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) を用いた Seahorse XFe24 細胞外フラックスアナライザーにより測定した。まず播種した細胞を 3 回洗浄し、10 mM d-グルコース、1 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM l-グルタミンを添加した Seahorse XF DMEM (Agilent, 103575-100) 500 μ L と交換した。Agilent XFe24 センサーカートリッジは、実験の 24 時間前に Seahorse XF Calibrant (Agilent, 100840-000) で水和し、0.1%DMSO、オリゴマイシン (ATP 合成酵素阻害剤、1 μ M)、カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP、ミトコンドリア酸化的リン酸化の強力な阻害剤、0.5 μ M)、ロテノン (ミトコンドリア複合体 I 阻害剤、0.5 μ M) + アンチマイシン A (ミトコンドリア複合体 III 阻害剤、0.5 μ M) をそれぞれのポートに入れた。OCR と ECAR は、試験化合物注入前に 3 回、すべての注入について 3 回測定した。データは Wave ソフトウェア (Agilent Technologies/Seahorse Bioscience) を用いて解析した。

【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、オートファゴソームおよびオートファジー基質マーカーである LC3 および p62 のタンパク質発現レベルを検討した結果、FipS は LC3-II/LC3-I および p62/GAPDH の発現を増加させたことから、オートファジーを活性化し、オートファゴソームを蓄積させることが示唆された。(図 1)。

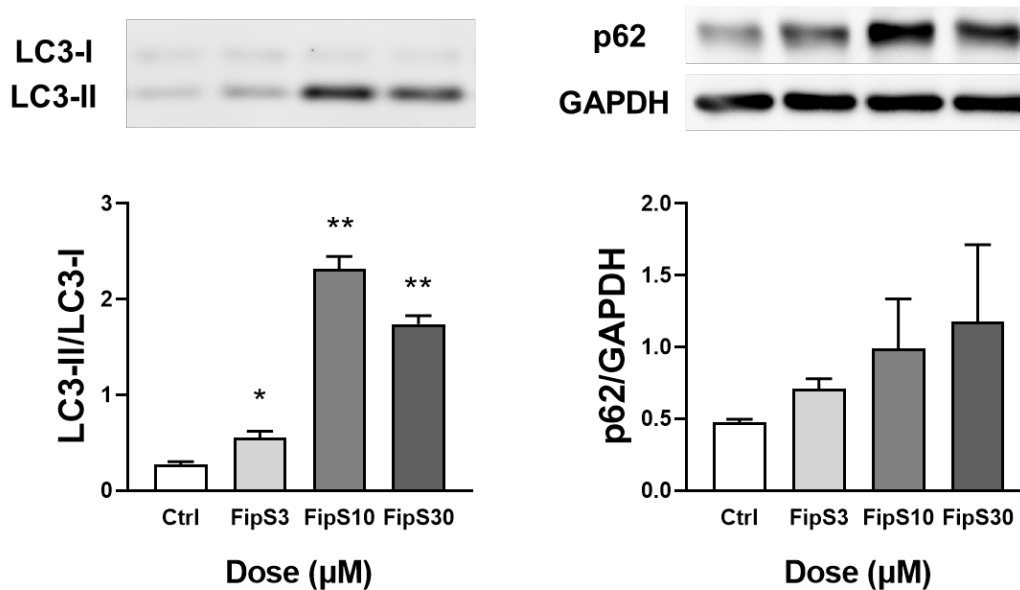


図 1. フェニルピラゾール系農薬の主要代謝物フィプロニルスルホン(FipS)が HMC3 のオートファジー活性に及ぼす影響

次に、FipS 曝露がミクログリアのミトコンドリアの代謝状態に及ぼす影響を詳細に解析するために、細胞外フラックスアナライザーを用いて各阻害剤投与後の細胞内酸素消費率(OCR)を評価した(図 2)。その結果、FipS は曝露直後において、プロトンリーク量の増加、ATP 産生量、最大呼吸商および予備呼吸商の低下を引き起こすことが明らかとなった(図 3)。

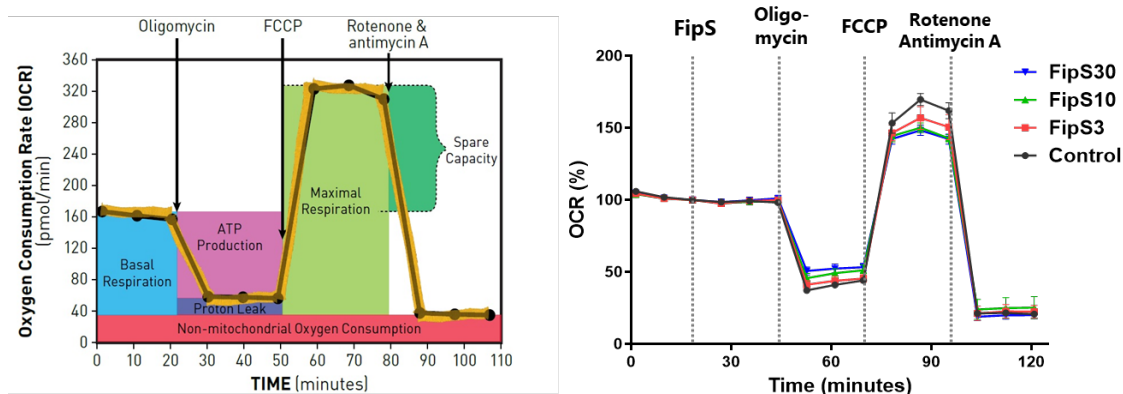


図 2. (左)細胞外フラックスアナライザーCell Mito Stress Test によって得られる典型的な結果、(右)FipS および各阻害剤曝露時の細胞内酸素消費率(OCR)の変動

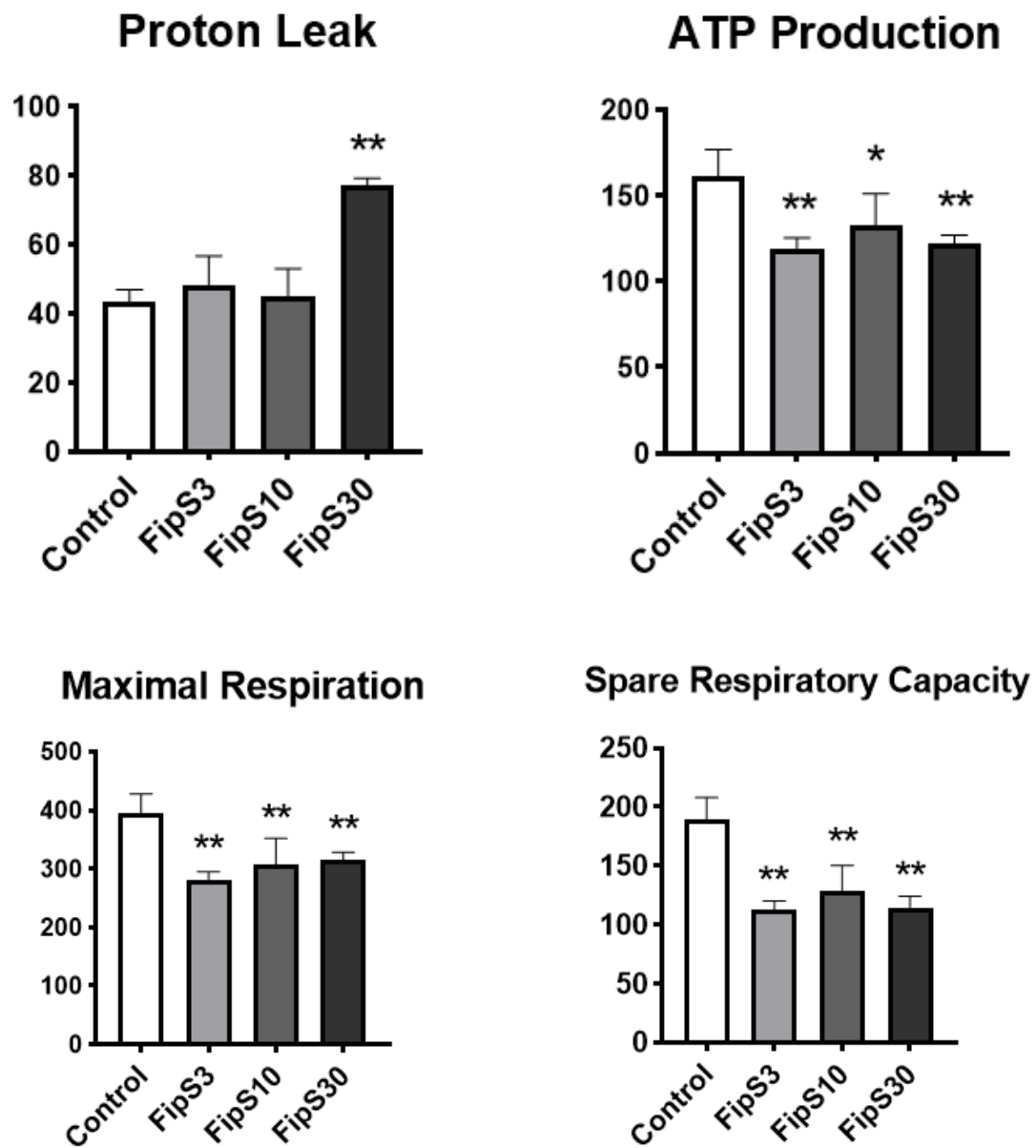


図 3. FipS 曝露がプロトンリーク量、ATP 産生量、最大呼吸商および予備呼吸商に及ぼす影響

【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フィプロニルの主要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細胞レベルの影響メカニズムとして、FipS がオートファジーの活性化を引き起こすことが明らかになった。さらに、FipS 曝露によりプロトンリーク量の増加、ATP 産生量、最大呼吸商および予備呼吸商の低下を伴ってミトコンドリアの代謝状態を変動させることを見出した。今後は、本曝露モデルを用いて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。