

1 1 . TLR4 内因性リガンド S100A8 を標的とした多価型ペプチドがん治療薬の開発

出口敦子、丸義朗
(薬理学)

〔目的〕 私たちはこれまでに、肺転移する前段階で Toll 様受容体 4(TLR4)内因性リガンドである S100A8 や SAA3 の発現上昇により TLR4 活性化を伴い、転移前微小環境が構築され、肺転移を亢進することを見いだしてきた。さらに、TLR4 内因性リガンドの S100A8 は血液中や腫瘍近傍の間質に発現しており、様々ながんにおいて高発現していることが報告されている。したがって S100A8 を阻害する薬剤はがんの進展を抑制することが期待されるため、本研究では、新規がん治療薬候補として、S100A8 を阻害するペプチド等を探索することとした。

〔方法〕 まず、S100A8 リコンビナントタンパク質と TLR4/MD-2 リコンビナントタンパク質との結合に対し、競合阻害活性の測定系を樹立した。この系を用いて、S100A8 と TLR4/MD-2 との結合に対して競合阻害ペプチドを同定した。S100A8 によって誘導される TLR4 依存性の NF κ B レポーター活性を同定したペプチドが阻害するか検証した。マウス背部に大腸がん細胞を移植し、所定時間後にペプチドを 1, 5, 10 mg/kg にて投与を開始し、皮下腫瘍のサイズを経時的に測定した。また、投与終了後マウス皮下腫瘍を採材し、抗 CD31 抗体、抗 SMA 抗体を用いた免疫組織学的検証により、腫瘍内の血管新生を評価した。

〔結果〕 私たちはこれまでに、S100A8 のカルボキシル末端側が TLR4/MD-2 への結合に関与することを見だし²⁾、本研究ではさらに結合領域を特定するため、5 アミノ酸オーバーラッピングペプチドを合成し、結合領域を含んだアミノ酸配列を特定した。アラニンスクニング解析の中で天然アミノ酸配列断片よりも TLR4/MD-2 への結合量が増加するペプチド(peptide3A5)を単離した。2 価型にすることにより、S100A8 と TLR4/MD-2 との結合に対し競合阻害活性を増強することがわかった。大腸がん細胞を移植したマウスに 2 価型 peptide3A5 を投与すると、皮下腫瘍の増殖を濃度依存的に抑制し、投与終了後のマウス皮下腫瘍を採材し、免疫組織学的解析により、2 価型 peptide3A5 血管新生の抑制と腫瘍血管の正常化を誘導することが示された。

〔考察〕 担がんマウスモデルを用いた解析において、これまでに開発した S100A8 多価型阻害ペプチドは単剤においても皮下腫瘍の増殖を抑制すること、また抗 VEGF 抗体併用や免疫チェックポイント阻害薬との併用により、抗腫瘍活性の増強を示した。今後、血中安定性の検証を進め、投与量、投与間隔を最適化する必要がある。

〔結論〕 S100A8 の TLR4/MD-2 への結合領域を標的とした S100A8 多価型阻害ペプチドを単離した。S100A8 多価型阻害ペプチドは腫瘍内血管新生を阻害すること、腫瘍血管の正常化を誘導することが見いだされた。今後、これまでに開発したペプチドの薬物動態解析を進める。

〔文献〕

- 1) Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. (2008) The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol.* 10: 1349-1355.
- 2) Deguchi A, Tomita T, Ohto U, et al. (2016) Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. *Oncogene* 35: 1445-1456

〔発表論文〕

- 1) Deguchi A, Watanabe-Takahashi M, Mishima T, et al. (2023) Novel multivalent S100A8 inhibitory peptides attenuate tumor progression and metastasis by inhibiting the TLR4-dependent pathway. *Cancer Gene Ther.* 30 : 973-984

〔学会発表〕

- 1) 出口敦子, 高橋美帆, 三島大志, 他. 新規 S100A8 多価型阻害ペプチドは TLR4 シグナル伝達経路を抑制し抗腫瘍活性を示す. 第 80 回日本癌学会学術総会, 2023 年 9 月, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

1 2. 体性感覚視床シナプスの機能的および構造的な改編機構

植田禎史、宮田麻理子

(生理学 (神経生理学分野))

〔目的〕 マウスの体性感覚視床では、感覚情報を伝える脳幹由来の上行性感覚線維と視床ニューロン間のシナプス結合は発達または末梢神経損傷により大規模に改編される。末梢神経損傷後の視床シナプス改編には GABA 作動性抑制性入力による持続性抑制の増強が関与する¹⁾。持続性抑制は細胞外・細胞間隙の GABA がシナプスの外側に局在する GABA_A 受容体に結合することで生じる Cl⁻イオンの持続的な細胞内流入である²⁾。マウスの体性感覚視床では発達期の段階で既にシナプス外 GABA_A 受容体が発現する³⁾。しかし、発達期の視床シナプス改編にこのシナプス外 GABA_A 受容体を介した持続性抑制が関与するかどうかはよくわかっていなかった。そこで、本研究では電気生理学および組織学的手法を用いて発達期における持続性抑制の変化と、持続性抑制がシナプス改編に影響するかを定量的に解析した。

〔方法〕 生後 10 日から 20 日にかけて 2 日齢毎に哺育 BL/6 マウスの体性感覚視床の急性脳スライス標本を作製した。このスライス標本を用いて単一の体性感覚視床ニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行った。持続性抑制電流を記録するため、膜電位固定法にて視床ニューロンの膜電位を +10 mV に固定した場合の保持電流を測定した。次に、視床ニューロン特異的なシナプス外 GABA_A 受容体のノックアウトを試みた。視床ニューロン選択的な Cre マウス (Pkcδ-Cre, 理研 BRC, 本学 ILA に委託済) と、視床のシナプス外 GABA_A 受容体を構成し、持続性抑制電流に必要とされる α4 サブユニットの flox マウス (米国ジャクソン研究所, 本学 ILA に委託済) を交配し、視床ニューロン特異的に α4 サブユニット発現を取り除いた。発達期の視床シナプス改編が完了した生後 3 週以降のこのマウスから視床の急性脳スライスを作製し、視床ニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行った。上行性感覚線維を電気刺激し、-70 mV に膜電位固定した視床ニューロンから興奮性シナプス後電流を記録した⁴⁾。

〔結果〕 マウスの体性感覚視床核では生後 12 日から 15 日にかけての期間が臨界期と呼ばれる可塑性が非常に高まる時期となり、シナプスの刈込みが促進される。ちょうど同じ時期、生後 12 日頃からマウスは自発的にヒゲを動かして周囲の探索を始める。臨界期にヒゲを抜いてヒゲ感覚を阻害するとシナプス刈込みが阻害されるため、臨界期のシナプス刈込みは感覚経験に依存して引き起こされる。この臨界期より前の発達期では、視床ニューロンにおける持続性抑制電流の振幅は非常に小さい。一方、臨界期を境に、その後の発達時期では持続性抑制電流の振幅が急激に増大する。臨界期にヒゲを抜いて感覚入力を阻害すると、持続性抑制電流の増強も抑制された。よって、臨界期の感覚経験は持続性抑制電流の増強に必要であることがわかった。そこで、この持続性抑制電流が発達期のシナプス刈込みに必要であるかを調べた。視床ニューロン特異的にシナプス外 GABA_A 受容体を脱落させた遺伝子改変マウスの脳スライスを用いて、視床ニューロンのシナプス形成を電気生理学的に評価した。その結果、シナプス外 GABA_A 受容体の発現をノックアウトした視床ニューロンでは上行性感覚線維のシナプス刈込みが抑制されていた。

〔考察〕 マウスの体性感覚視床では $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ 、 γ の 3 つのサブユニットがシナプス外 GABA_A 受容体を構成する。この内、受容体を介した Cl⁻イオンの細胞内流入には $\alpha 4$ と γ サブユニットが重要だと言われている。過去の報告から、 γ サブユニットは胎生期の時点から視床に発現する³⁾。一方、 $\alpha 4$ サブユニットの視床発現は生後に上昇する³⁾。電気生理学的に持続性抑制電流が記録されるには、 $\alpha 4$ サブユニットが十分に発現し、膜に移行する必要がある。生後 12 日以降の臨界期を境に持続性抑制電流が増強してくる背景には、このシナプス外 GABA_A 受容体サブユニットの生後発現パターンが関係すると考えられる。 $\alpha 4$ サブユニットが膜へ移行するには代謝性シグナルの活性化が関与する⁵⁾。臨界期に一気に感覚入力が増大すると、体性感覚経路の神経活動は亢進すると予想される。その結果、臨界期の感覚経験依存的な $\alpha 4$ サブユニットの膜移行と、それに伴う電流増大が生じるのではないかと考えている。シナプス外 GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニットがないと視床ニューロンに入力する上行性感覚線維のシナプス刈込みは十分に進行しない。この結果から、何らかの抑制性入力と興奮性入力のバランスがシナプス刈込みの促進に重要である可能性が示唆される。今後詳しい神経メカニズムを追及したい。

〔結論〕 発達期のマウス体性感覚視床では、感覚経験依存的にシナプス刈込みが促進される臨界期に、視床ニューロンにおけるシナプス外 GABA_A 受容体を介した持続的な Cl⁻イオンの細胞内流入（持続性抑制）の振幅が増強される。この抑制性入力の増強もまた感覚経験・神経活動依存的に生じる。また、視床ニューロン特異的にシナプス外 GABA_A 受容体を遺伝的にノックアウトした場合、発達期のシナプス刈込みは阻害される。よって、今回の研究結果は発達期の臨界期に増強される持続性抑制がシナプス刈込みを促進し、視床回路の成熟化に寄与する役割を持つ可能性を示唆する。

〔文献〕

- 1) Nagumo Y., Ueta Y., Nakayama H., et al. (2020) Cell Rep. 31(12): 107797
- 2) Farrant M., and Nusser Z. (2005) Nat. Rev. Neurosci. 6(3): 215-229
- 3) Laurie D.J., Wisden W., Seeburg P.H. (1992) J. Neurosci. 12(11): 4151-4172
- 4) Ueta Y., and Miyata M. (2021) STAR Protoc. 2(3): 100743
- 5) Connerlly W.M., Errington A.C., Di Giovanni G., et al. (2013) Front. Neural Circuits 7: 171

〔発表論文〕

- 1) Ueta Y. and Miyata M. (2023) Functional and structural synaptic remodeling mechanisms underlying somatotopic organization and reorganization in the thalamus. Neurosci. Biobehav. Rev. 152: 105332.

〔学会発表〕

- 1) Ueta Y. Sekino S. and Miyata M. The developmentally regulated tonic inhibitory tone is necessary for critical period plasticity in the somatosensory thalamus. 第 45 回日本神経科学大会、仙台、2023/8

1.3. 全身性 RNA 干渉の効率を変える分子の遺伝解析

出嶋克史¹、吉田慶太¹、今江理恵子¹、末廣勇司¹、吉名佐和子¹、三谷昌平^{1,2}

(¹生理学 (分子細胞生理学分野)、²総合医科学研究所)

〔目的〕 RNA 干渉 (RNAi) は二本鎖 RNA を細胞に投与すると、相同性のある mRNA を分解して機能阻害を起こす現象である。モデル生物である線虫で最初にこの現象が発見されたが、その後、ヒトを含む多種類の生物種で同様の現象が起こることが知られている。特に、ヒトなどの哺乳類細胞では、人工合成で作成した短い二本鎖 RNA を投与することで簡単に遺伝子発現抑制ができることから、多用されるに至っている。線虫では二本鎖 RNA を投与すると、細胞に取り込まれた二本鎖 RNA が RNA 分解を起こすだけでなく、細胞外に分泌された後、別の細胞に取り込まれて再度 mRNA の分解を繰り返し、全身に作用を発揮する。線虫を実験に用いることにより、餌 (大腸菌) に予め遺伝子導入しておいた二本鎖 RNA を摂取し、腸細胞で取り込むことで全身性 RNAi を起こすことが可能である。我々は小胞輸送に関わる分子に着目することで、RNAi の強度が強くなる表現型 (Enhanced RNAi; Eri) を呈する変異体や RNA 干渉の強度が弱くなる表現型 (RNAi defective; Rde) を呈する変異体を見つけること、それらの変異体原因遺伝子産物の機能解析や相互作用解析により、小胞輸送を介して二本鎖 RNA が組織細胞間を伝播する仕組みを解明することを目的とした。

〔方法〕 線虫は大腸菌を餌として飼育することが可能である。予め大腸菌に二本鎖 RNA を発現するプラスミド・ベクターを導入しておき、これを食べさせることで全身性 RNAi を起こす。種々の標的遺伝子の二本鎖 RNA を発現する大腸菌を用意しておき、RNAi を行うことで、EMS (ethyl methanesulfonate) による変異導入した個体や特定の遺伝子変異体において、RNAi が増強しているか減弱しているかを表現型によって判定することが可能である。これらの変異体の表現型が見つかった場合、変異体同士を交配して二重変異体や三重変異体を作出することが可能であり、Rde や Eri を呈する変異体遺伝子間の機能的な関係を調べることも可能である。

〔結果〕 我々は *rsd-3* 遺伝子が二本鎖 RNA の取り込みに重要な役割をしており、*rsd-3* 変異体では RNAi が効きにくくなることを見出した¹⁾。そこで、*rsd-3* 変異体をバックグラウンドとしてこの変異体のサプレッサーをスクリーニングした。蛍光タンパク質遺伝子を発現した *rsd-3* 変異体に変異導入を行い、蛍光タンパク質遺伝子に対する RNAi を行うことで、蛍光消失が起こるようになる (RNAi が起こり易い) 個体をスクリーニングした。その結果、Eri 表現型を呈する変異体を取得した。変異体のゲノム配列を次世代シーケンサーで解読することにより、原因遺伝子の特定を行った。そのうちの 1 つの遺伝子 (*zipt-9*) について解析を進めた。ZIPT-9 タンパク質は亜鉛輸送担体であり、エンドソームに局在し、エンドソームの亜鉛を細胞質に輸送するものと推定された。*zipt-9* 変異体の表現型はヒトホモログの cDNA を導入することで回復した。種々の標的に対して RNAi を行った結果、*rsd-3* 変異体との二重変異体でも RNAi が有効になること、*zipt-9* 変異体単独でも野生型個体より RNAi が強力に作用することが分かった。作用としては、二本鎖 RNA の取り込みあるいは細胞内処理を介して RNAi を増強することが分かった。

我々は、線虫に変異導入した後、*bli-1* 遺伝子に対する RNAi を行い、効果が弱くなる個体をスクリーニ

ングした。その結果、*rexd-1* 遺伝子と *tbc-3* 遺伝子を見出した。いずれの変異体も二本鎖 RNA の分泌に関わることが明らかになった。

〔考察〕 線虫を用いて、小胞輸送を介して RNAi の効果を増強する変異体や減弱する変異体が見つかった。これらの原因遺伝子は野生型個体ではそれぞれ RNAi を抑制していたものと RNAi に必要な遺伝子であったと考えられる。

〔結論〕 線虫を用いて RNAi の効果に影響のある分子の作用経路を解明することで、細胞内や細胞間での二本鎖 RNA の動きと RNAi のメカニズムが解明できる可能性が考えられる。

〔文献〕

- 1) Imae R, Dejima K, Kage-Nakadai E et al. (2016) Sci Rep. 6:28198.

〔発表論文〕

- 1) Tabara H, Mitani S, Mochizuki M et al. (2023) A small RNA system ensures accurate homologous pairing and unpaired silencing of meiotic chromosomes. EMBO J. 42(11): e105002.
- 2) Dejima K, Imae R, Suehiro Y et al. (2023) An endomembrane zinc transporter negatively regulates systemic RNAi in *Caenorhabditis elegans*. iScience. 26(6):106930.
- 3) Zhang H, Zhu Y, Suehiro Y et al. (2023) AMPK-FOXO-IP3R signaling pathway mediates neurological and developmental defects caused by mitochondrial DNA mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 120(36): e2302490120.
- 4) Higuchi S, Suehiro Y, Izuhara L et al. (2023) BCL7B, a SWI/SNF complex subunit, orchestrates cancer immunity and stemness. BMC Cancer. 23(1): 811.
- 5) Yoshida K, Suehiro Y, Dejima K et al. (2023) Distinct pathways for export of silencing RNA in *Caenorhabditis elegans* systemic RNAi. iScience. 26(10): 108067.
- 6) Yoshina S, Izuhara L, Mashima R et al. (2023) Febuxostat ameliorates muscle degeneration and movement disorder of the dystrophin mutant model in *Caenorhabditis elegans*. J Physiol Sci. 73(1): 28.
- 7) Gengyo-Ando K, Tateyama M, Mitani S et al. (2023) A humanized *Caenorhabditis elegans* model for studying pathogenic mutations in VPS45, a protein essential for membrane trafficking, associated with severe congenital neutropenia. MicroPubl Biol. 10.17912: 001052.
- 8) Yoshida K, Suehiro Y and Mitani S. (2024) Protocol for forward genetic screening to identify novel factors involved in a biological process in *Caenorhabditis elegans*. STAR Protoc. 5(2):103114.

〔学会発表〕

- 1) Dejima K and Mitani S. Genetic analysis of the RNAi defective mutants for zinc-binding molecules. 24th International C. elegans Conference, Glasgow, Scotland 2023/6

14. 新機抗マラリア薬として期待される化合物 X が引き起こす熱帯熱マラリア原虫の細胞死の観察

本間一

(衛生学公衆衛生学 (公衆衛生学分野グローバルヘルス部門))

〔目的〕 マラリアの年間の患者数は約 2 億 4 千 9 百万人、死者数は約 58 万人であり、特にアフリカ、アジアの流行地域においては公衆衛生上の深刻な問題である¹⁾。抗マラリア薬による化学療法はマラリア治療の柱であるが、最も重篤な症状を引き起こす熱帯熱マラリア原虫において薬剤耐性株が出現することがマラリア制圧を困難にしている²⁾。既存の抗マラリア薬のほとんど全てに耐性株が報告されており、そのため新規薬剤の開発が常に求められる。化合物 X は抗マラリア活性を示し、新規の抗マラリア薬として期待される。ピアコアによる分子間相互作用から化合物 X はタンパク質 A への結合性が示唆されるが、抗マラリア活性の機序は不明な点が多い。化合物 X の機序解明を目指し、1) 熱帯熱マラリア原虫に化合物 X およびその誘導体を曝露した場合の細胞の形態変化の観察、2) 化合物 X の誘導体に N-アセチルシステイン (NAC) を添加した場合の薬効変化を調べた。

〔方法〕 化合物 X およびその誘導体の IC₅₀、IC₉₀、IC₉₉ を算出するために、化合物の希釈系列を作製し熱帯熱マラリア原虫のリング期に対して 72 時間曝露した。72 時間曝露後に、50 μ L の原虫培養液を SYBR Green I を含む溶解液 50 μ L と混和し、1 時間の室温でのインキュベート後にマルチプレートリーダー MD SpectraMax i3 で蛍光を測定した。測定値について R でロジスティック回帰分析を行い、IC_n 値を算出した。

熱帯熱マラリア原虫培養株のリング期に対して 3 $\times$ IC₅₀ と 4 $\times$ IC₅₀ の濃度の化合物を曝露して 28–43 時間経過後に薄層血液塗抹標本を作製した。光学顕微鏡下で塗抹標本を観察し、原虫細胞の形態変化を対象区 (非曝露区) と比較した。

化合物曝露した結果、原虫細胞のピクノーシスが観察された。ピクノーシスを引き起こす抗マラリア薬としてアルテミシニンがある。アルテミシニン曝露中に NAC を添加するとピクノーシスが低減することが報告されており³⁾、NAC 添加における化合物 X 誘導体の薬効変化を、IC_n 値を算出して検証した。

〔結果〕 化合物 X 誘導体の IC₅₀ 値は 50 nM 以下であり、既存の抗マラリア薬に匹敵する抗マラリア活性を持っていることが明らかになった。熱帯熱マラリア原虫の赤血球内でのサイクルは 48 時間であるが、3 $\times$ IC₅₀ あるいは 4 $\times$ IC₅₀ の濃度の化合物 X 誘導体を 28 時間曝露すると、細胞周期が途中で停止した原虫細胞が多く観察された。さらに、~43 時間の観察ではピクノーシスと考えられる原虫の細胞質と核が著しく凝縮したような像が多く観察された。ピクノーシスを引き起こす既存の抗マラリア薬としてアルテミシニンがある。フリーラジカルを産生することで抗マラリア活性を示すアルテミシニンでは、抗酸化剤である NAC を添加すると薬効が低下することが報告されている³⁾。同様の傾向が化合物 X 誘導体でも生じるかを調べるため、0.5 mM と 2 mM の NAC を添加した状態で抗マラリア活性を評価した。その結果、対照として試験したアルテミシニンでは、既報のように抗マラリア活性が低下する傾向が観察されたが、化合物 X 誘導体では、反対に、濃度依存的に抗マラリア活性が増強された。

〔考察〕 化合物 X およびその誘導体に熱帯熱マラリア原虫を曝露すると、アルテミシニンと同様にピクノーシスが引き起こされた。化合物 X およびその誘導体は、構造からフリーラジカルを発生するとは考えにくい。化合物 X 誘導体に NAC を添加すると、アルテミシニンの場合とは反対に活性が増強されることが示された。これらの観察結果から、熱帯熱マラリア原虫への化合物 X 誘導体曝露は、アルテミシニン曝露の場合と形態的に類似したピクノーシスを引き起こすが、フリーラジカル産生によるアルテミシニンの抗マラリア活性とは異なる機序で活性を示していると考えられた。しかし、NAC の添加によってなぜ化合物 X 誘導体の抗マラリア活性が増強されるかは不明である。機序解明のためにさらなる研究を行う必要性がある。

〔結論〕 化合物 X およびその誘導体は熱帯熱マラリア原虫に対してピクノーシスを引き起こす。抗マラリア活性を示す機序はアルテミシニンのようなフリーラジカル産生ではないと考えられる。

〔文献〕

- 1) World Health Organization. (2024) World Malaria Report 2023
- 2) Menard D and Dondorp A (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 7(7): 1-24
- 3) Asahi, H., M. Niikura, S. I. Inoue, F. Sendo, F. Kobayashi, and A. Wada (2023). Dihydroartemisinin Disrupts Zinc Homeostasis in *Plasmodium falciparum* to Potentiate Its Antimalarial Action via Pyknosis. ACS Infect Dis 9 (7): 1303–9

15. カドミウムのヒト近位尿細管細胞における毒性発現機構

藤木恒太¹、田邊賢司²、菅谷健³、松岡雅人¹

(¹衛生学公衆衛生学(環境・産業医学分野)、²総合医科学研究所、³聖マリアンナ医科大学医学部腎臓・高血圧内科)

〔目的〕 カドミウム曝露により、腎近位尿細管細胞において細胞死が誘導されるが、その分子機構は未だ解明されていない。我々はその分子基盤を明らかにすべく解析を行っており、現在、不死化ヒト近位尿細管由来上皮細胞(HK-2細胞およびRPTEC/TERT1細胞)を用いてカドミウム曝露依存的尿細管細胞死における一次繊毛の役割について解析を行っている。

一次繊毛は、中心体から伸長した9本の微小管を中心に形成される構造体であり、細胞静止(G0)期に形成される。また、一次繊毛内の微小管がレールとなり、モータータンパク質(KinesinおよびDynein)が微小管上を動くことで、PTCH1(Hh受容体)を含む様々な受容体が一次繊毛の膜状に輸送され、配置される。尿細管細胞を含む多くの終末分化した細胞は一次繊毛を有しており、近年、アルコールやシスプラチンといった外部(環境)刺激に対して細胞が応答するために、一次繊毛が重要な役割を担うことが報告されている。そこで、我々は尿細管細胞におけるカドミウム刺激応答においても一次繊毛が重要な役割をもつのではないかと考え、その可能性について検討している。

〔方法〕 一次繊毛を形成させるため、コンフルエントな条件下でHK-2細胞およびRPTEC/TERT1細胞を培養し、その後、塩化カドミウム(CdCl₂)を1~30時間曝露した。細胞死率は、トリパンブルー染色法を用いて検出した。また、一次繊毛を可視化するために、抗Pericentrin抗体および抗Acetyl-tubulin(K40)抗体を用いて染色後、蛍光顕微鏡(総研機器:Ti2E)を用いて観察した。

〔結果および考察〕 まずカドミウム刺激が、一次繊毛に対してどのような影響を及ぼすのか調べるため、一次繊毛を抗Pericentrin抗体および抗Acetyl-tubulin(K40)抗体を用いて染色し、可視化した。その結果、カドミウム曝露下のHK-2細胞およびRPTEC/TERT1細胞では、一次繊毛形成率が低下することが明らかとなった。また、カドミウム刺激したHK-2細胞では、一次繊毛形成・伸長に重要な輸送因子IFT88の発現量が減少する傾向がみられた。このことから、カドミウム刺激下の尿細管細胞ではIFT88の発現量が低下し、その結果、一次繊毛が崩壊・短縮した可能性が考えられる。さらに、カドミウム刺激下におけるIFT88および一次繊毛の役割を調べるため、IFT88 siRNA処理の一次繊毛形成およびカドミウム曝露依存的細胞死に対する影響を検討した。その結果、IFT88 siRNA処理したHK-2細胞およびRPTEC/TERT1細胞では、一次繊毛形成率が低下し、一次繊毛の長さが低下する傾向が得られた。また、IFT88 siRNA処理した細胞では、コントロール細胞と比べてカドミウム曝露依存的細胞死が抑制される結果が得られた。このことから、カドミウム刺激下の尿細管細胞における一次繊毛形成の低下は、カドミウム毒性から細胞を保護する役割をもつと考えられる。

〔結論〕 本研究結果から、①カドミウム刺激下において一次繊毛が崩壊・短縮すること、②尿細管細胞における一次繊毛の崩壊・短縮は、カドミウム毒性に対して細胞を保護する役割があること、を明らかとした。今後は、IFT88以外の一次繊毛形成に関わる因子のカドミウム曝露下の動態についても検出

し、一次繊毛がカドミウム刺激下において崩壊・短縮する機構の詳細を明らかとしたい。また、一次繊毛を形成することが、どのようにしてカドミウム毒性を亢進するのか、その機序についても明らかとしていきたい。

〔学会発表〕

1) 令和 6 年度環境省「重金属などによる健康影響に関する総合的研究」研究発表会

16. 銀ナノ粒子による細胞死誘導と Rubicon の発現影響

宮山貴光

(衛生学公衆衛生学 (環境・産業医学分野))

〔目的〕 銀ナノ粒子は細胞死を誘導することから抗がん剤など医療応用が期待されているため、有効性と安全性の確立に向けた細胞死誘導機構の全容解明が待たれている。本研究では、銀ナノ粒子による細胞死誘導機構解明の一環として、オートファジーのネガティブレギュレーターとして知られる Rubicon の発現影響を評価し、細胞死との関連性について調べた。

〔方法〕 肺胞上皮腺がん細胞 A549 を用いて銀ナノ粒子を 0 から 200 $\mu\text{g Ag/mL}$ 処理し、Rubicon の発現解析並びに遺伝子改変に伴う影響、すなわち細胞死、リソソームの内腔の破綻、オートファゴソーム形成を観察した。

〔結果〕 銀ナノ粒子を用量依存的に処理すると細胞死の誘導とともに、Rubicon、リソソームのマスターレギュレータである TFEB、リソソーム局在する酵素カタプシン B はそれぞれ減少し、オートファジーマーカーの LC3B-II と p62 は増大した。内腔 pH の上昇とオートファゴソーム形成の増大も認めた。リソソームマーカーの LAMP1 と LAMP2 の発現に変化は認めなかった。異なる 2 種類の siRNA で Rubicon をノックダウンして銀ナノ粒子を併用処理した結果、いずれのノックダウン細胞においても銀ナノ粒子の細胞死増大を認めた。

〔考察・結論〕 銀ナノ粒子は、オートファジー破綻で細胞死を誘導するが、Rubicon 発現を RNA 干渉法で抑制すると細胞死が増大することから、現在、カタプシン B、TFEB、p62、LC3B-II、LAMP1、LAMP2 の発現解析と内腔 pH とオートファゴソーム形成を検討している。リソソーム破綻を起点とするオートファジー破綻が起こる過程において、Rubicon が関与する可能性が考えられる。

〔学会発表〕

- 1) 宮山貴光. 肺がん細胞を用いた銀ナノ粒子の細胞内挙動と細胞応答の解析. 第 23 回分子予防環境医学研究会、福井、2024/1
- 2) 宮山貴光、松岡雅人. ヒト肺胞上皮腺がん細胞における銀ナノ粒子のオートファジー破綻とルビコンの発現影響. フォーラム 2023 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、広島、2023/9
- 3) Miyayama T., Matsuoka M. Combined use of AgNPs and salubrinal promotes cell death by modulating endoplasmic reticulum stress/autophagy in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-X), Taipei, Taiwan, 2023/7

17. 入浴中に放出されたヒト DNA を用いた入浴時間の検討

町田光世、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 法医学では事件・事故の発生場所や死体が置かれていた場所の特定は重要な鑑定事項である。浴槽、プール、河川、海水浴場等の水中は溺水事故の発生場所であり、稀には死体投棄の場所にもなる。溺水患者が水中から救出され病院に搬送された場合等では溺水の発生場所の特定が必要である。水中と臓器中のプランクトンの種類から溺水場所を調べることがあるが、浴槽やプールの水にプランクトンは通常含まれていない。水中から死亡者や他者の DNA を検出すれば死亡場所や死亡状況の特定につながると予想される。本研究では入浴中の水に含まれるヒト DNA 量や DNA 分解度、正しく検出された STR ロークラス数など入浴中に変化する 11 因子を経時的に調べ、入浴時間に関係する因子を多変量解析により検討した。

〔方法〕 11 名のボランティアが各自浴槽内に入浴し、入浴前、入浴 1 分、2 分、5 分、10 分後に採取した浴槽内の水 2 リットルをガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ過後のろ紙を細断後 QIAamp DNA Investigator kit で DNA を抽出した。ヒト DNA 量は Kapa hgDNA Quantification kit の 41 bp の DNA 濃度を基にして算出した後、DNA 分解度は 129 bp と 41 bp の DNA を定量し、129 bp:41 bp の比を計算した。抽出した DNA は AmpFlSTR Identifiler Plus kit で増幅し STR 解析を行った。本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て実施した (2021-0007)。

〔結果・考察〕 入浴時間とヒト DNA 量の関係は相関係数で相関はなかったが ($r=0.27$)、入浴時間と DNA 分解度の関係は相関係数 $r=0.69$ であり、入浴時間が長いほど分解されていない DNA が増加した。入浴時間と正しく検出された STR ロークラス数の関係は相関係数 $r=0.56$ であり、入浴時間が長いほど正しく検出された STR ロークラス数が増加する傾向を示した。特に入浴 5 分と 10 分では D19S433、D3S1358、D8S1179、D5S818 の 4 ロークラスが増幅されやすく、D7S820、D18S51、CSF1PO、D2S1338 の 4 ロークラスは増幅されにくい傾向がみられた。また、入浴時間とアリルピーク高の関係は相関係数 $r=0.691$ であり、入浴時間が長いほどアリルピーク高が高まる傾向を認めた。以上のことから、浴槽内の水に存在するヒト DNA の解析では、入浴時間が長いと各 STR ロークラスの増幅傾向に差が生じるが、DNA 分解度や正しく検出された STR ロークラス数、アリルピーク高からヒトが水中に浸かっていた時間の推定が可能と考えられた。

18. LC-QTOF/MS による大麻由来のカンナビジオール オイルの高感度分析と毒性評価

中尾賢一朗、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 「カンナビジオール(CBD)オイル」は美容や健康補助食品として、あるいは電子タバコのリキッドとして輸入販売され、誰でも簡単に入手できる。CBD は大麻草の茎や種子に含まれるが、向精神成分であるテトラヒドロカンナビノール(THC)と違い、向精神作用がなく法規制されない成分である。しかし本研究者は実務において、CBD オイルから THC を検出した¹⁾。現在流通している CBD オイルには様々な比率で THC と CBD が含まれているとみられ、その消費量は増加している²⁾。しかしながら THC の有害性の一つである潜在的な DNA 損傷作用に関する研究は遅れており、特に THC と CBD の含有比が 1 対 1 以外における脳への影響を調べた研究は少ない³⁾。そこでこの研究では、THC 及び CBD の脳内濃度と脳細胞の DNA 損傷の有無を調べ、測定した薬物濃度と DNA 損傷度の関係を探る。今年度は引き続きコントロールマウスを作製した。

〔方法〕 6 週齢 ddY 系オスマウス (n=3) に、エタノール : Tween80 (界面活性剤) : 生理食塩水 = 1 : 1 : 18 の割合で混和したコントロール溶液を 1 日 1 回、5 日間連日腹腔内投与した。最後の薬物投与 120 分後にイソフルラン吸入による深麻酔下で開胸し、右心房切損による放血で安楽死後すぐに脳を採取した。脳は -80℃で冷凍保存した。

〔今後の予定〕 マウスに THC 単独、CBD 単独及び任意の混合比で THC と CBD を混和させたものを投与し、液体クロマトグラム四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS)を用いて脳内の THC、CBD、を定量する。

〔文献〕

- 1) Ken-ichiro Nakao K., Tatara Y., and Kibayashi K. (2022) Res. Pract. Forens. Med. 65: 155-160.
- 2) Madras BK. (2019) Neuropsychopharmacology. 44: 215-216.
- 3) Withey SL., Bergman J., Huestis MA., et al. (2020) Drug Alcohol Depend. 213: 108129.

19. 外傷性脳損傷マウスにおける認知機能の解析

島田亮、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 髄膜リンパ管は、脳脊髄液と脳の組織液を、頸部深リンパ管を経由し、深前頸リンパ節に輸送している。我々は外傷性脳損傷が髄膜リンパ管の障害を引き起こすことを報告した。また、脳損傷後、高齢になると認知機能が低下するとの報告がある。従って、脳損傷後の髄膜リンパ管障害は時間が経つにつれて脳に影響を及ぼすと考えられる。本研究は、高齢マウスの外傷性脳損傷モデル及び頸部深リンパ管結紮モデルの認知機能の変化を解析した。

〔方法〕 損傷群は6週齢のマウスの頭蓋骨に骨窓を開け、髄膜の上から打撃を加えて大脳皮質に損傷を形成した。Sham群は6週齢のマウスに髄膜の損傷を最小限にするため、骨窓を開けず、骨窓と同大の頭蓋骨の外板と板間層をドリルで削り、内板を残し、上下可動化した骨片が髄膜に触れる手術を行った。頸部深リンパ管結紮群は1.5年齢のマウスに頸部皮膚を切開し、深前頸リンパ節を露出し、リンパ節上部の深リンパ管を結紮した。脳損傷後1.5年の損傷群のマウス、手術後1.5年のSham群のマウス、頸部深リンパ管結紮後6週のマウスについて、Object location test、Novel object recognition、Morris water mazeによる認知機能検査を行った。

〔結果〕 位置認識試験(Object location test)及び新奇物体認識試験(Novel object recognition)の探索率は、脳損傷群及び頸部深リンパ管結紮群がSham群と比べて有意に減少した。モリス水迷路(Morris water maze)の訓練試行では、プールにある足場にたどり着く時間は脳損傷群及び頸部深リンパ管結紮群がSham群と比べて有意に増加した。モリス水迷路の探索試行では、プールに足場があった1/4区画に滞在時間の割合は脳損傷群及び頸部深リンパ管結紮群がSham群と比べて有意に減少した。

〔考察、結論〕 脳損傷群及び頸部深リンパ管結紮群の認知機能が低下したことが示された。今後、脳損傷と頸部深リンパ管結紮がどのように脳に影響を及ぼしているか調べる予定である。

〔文献〕

- 1) Maloveska, M. (2018) Neurol. Res. 40: 372-380.
- 2) Shimada R, Nakao K, Kibayashi K, et al. (2012) J.Clin.Neurosci. 19(3): 447-451.
- 3) Da Mesquita, S. (2018) Nature 560: 185-191.
- 4) Shimada R, Abe K, Kibayashi K, et al. (2014) Neurol.Res. 36(3): 239-246

〔学会発表〕

- 1) 島田亮、木林和彦. 外傷性脳損傷における高齢マウスの認知機能の解析. 第93回日本法医学会学術関東地方集会、千葉、2024/10

20. 外傷性脳損傷による脳内 DNA 断片化の観察

多々良有紀、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 細胞は癌やストレスなどにより DNA が断片化して細胞死を来す。外傷性脳損傷においても脳内の DNA 断片化が後遺障害や死亡に関与する可能性がある。DNA 断片化ではヒストン H2A.X がリン酸化 (γ H2A.X) されることが知られている。本研究では、外傷性脳損傷の悪化機序を解明するため、外傷性脳損傷後の脳内における γ H2A.X の経時的変化と分布を観察し、DNA の断片化が生じた細胞を同定した。

〔方法〕 8～10 週齢の雄マウスに頭皮切開後脳挫傷作成装置で局所性脳損傷を施し損傷群とした (controlled cortical impact model)。頭皮切開のみで脳損傷なしのマウスをシャム群とした。受傷後 1、3、7、14 日に PBS と 4%PFA/PB で灌流固定し脳を摘出した。凍結切片を作製し抗 γ H2A.X 抗体で免疫組織化学染色を行い、損傷側と非損傷側で $500\ \mu\text{m}^2$ 以上の陽性細胞数を比較した。また、抗 γ H2A.X 抗体陽性細胞を同定するために抗 GFAP、抗 Iba1、抗 NeuN 抗体を用いて多重染色を行った。

〔結果と考察〕 抗 γ H2A.X 抗体陽性細胞は視床に観察された。損傷群では受傷後 3 日および 7 日に損傷側で非損傷側よりも有意に多くの陽性細胞が認められた。シャム群では全期間を通じて陽性細胞数が少なく、損傷側と非損傷側で有意差はなかった。また、多重染色により抗 γ H2A.X 抗体陽性細胞は抗 NeuN 抗体陽性細胞と重複し、H2A.X のリン酸化は神経細胞で生じていた。外傷性脳損傷では受傷後に視床の神経細胞に DNA 断片化が生じ、視床の DNA 断片化は神経機能障害に関与する可能性が示唆された。

〔学会発表〕

- 1) 多々良有紀、島田亮、木林和彦. 外傷性脳損傷による脳内 DNA 断片化の観察. 第 107 次 日本法医学学会学術全国集会、神奈川県小田原市、2023/6

