

気液界面培養条件下の細胞へのガス状物質 および微小粒子状物質曝露の影響評価法の検討

—NO₂ 曝露による気道上皮細胞の遺伝子発現解析—

Examination of an Evaluation Method for Health Effects of Exposure to Gas and Particulate Matter under Air-Liquid Interface Culture Conditions.

- Gene Expression Analysis of Airway Epithelial Cells Exposed to Nitrogen Dioxide -

伊藤 剛*¹ 村木 直美*² 田村 久美子*² 佐々木 左宇介*²
Tsuyoshi ITO Naomi MURAKI Kumiko TAMURA Sosuke SASAKI

Abstract

To examine the usefulness of our cell exposure system for the evaluation of inflammatory responses, we analyzed the expression of inflammation-related genes in airway epithelial cells exposed to nitrogen dioxide using the cell exposure system. As a result, the expression change of inflammation-related genes induced by nitrogen dioxide could be clearly observed in lung carcinoma cells (A549), but not in primary cells (MucilAirTM). This result showed the usefulness of the cell exposure system for the evaluation of inflammatory response, however, it is necessary to further study the effective use of primary cells.

1. はじめに

これまで自動車排気等のガス状物質および微小粒子状物質の健康影響は主に動物曝露実験により評価されてきたが、最近では培養細胞を用いた評価に対する関心が高まっている。しかし、培養細胞を用いた実験は汎用性が高く、研究者が独自の視点で様々な実験条件を設定するため、それぞれの実験を公正に比較することが難しい。そこで我々は、自動車排気の*in vitro*評価法の標準化を目指し、その基本骨格の構築を目指している。

自動車排気は呼吸により取り込まれることから、その影響評価では吸入曝露を反映した気液界面培養条件下での細胞曝露が重要である。気液界面培養条件下では細胞は乾燥しやすく、長時間送気しながら細胞を安定した状態に保つことは難しい。その一方で、近年の自動車排気は大幅に改善されていることから、微弱な排気の影響を感度良く検出するためには長時間曝露可能な実験系が求められる。これらのことから、我々は送気の湿度を制御

するために加湿器を導入し、細胞を安定した状態で6時間連続曝露可能な細胞曝露システムを構築した¹⁾。さらに、本細胞曝露システムを用い、実際に大気汚染物質や自動車排気等を細胞に曝露し、炎症応答を鋭敏に検出できることを確認する必要がある。そこで本研究では、我々の細胞曝露システムの炎症応答評価への利用可能性を検討することを目的に、大気や自動車排気に含まれており、炎症を誘導することが広く知られているNO₂の細胞曝露実験を実施し、炎症関連遺伝子の発現変動を解析することとした。

2. 方法

細胞株はヒト肺上皮細胞A549 (ECACC)、培地は10 %FBS, 15 mM HEPES含有DMEM/F12 (Gibco)を用い、0.375×10⁶ cells/mLで6 well cell culture insert (BD)に2 mL播種し、翌日実験に供した (n=3)。また、正常細胞としてはヒト気道上皮細胞MucilAirTM (Epithelix)、培地は15 mM HEPES含有MucilAirTM Culture

*1 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部
博士(医学)

*2 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部

Medium (Epithelix) を用いた。

細胞曝露にはCultex®モジュールを用いた。A549およびMucilAir™は6および24 well用のCell culture insertを用い、Cultex®モジュール内の送気流量を8.3および1.0 cc/min/insertに設定し、相対湿度85 %、培地温度37°Cの条件を維持した。曝露物質はNO₂を用い、1.25、2.5および5.0 ppmの濃度に調整し、対照として清浄空気 (Clean air : CA) 曝露を設定した。曝露時間は、A549は1、3、6時間、MucilAir™は3時間とした。

曝露後、total RNAを回収し、Cy3-標識cRNA調製から、ハイブリダイゼーション、スキャニングまで、Agilent社の推奨プロトコールに従った。DNAマイクロアレイはSuperPrint G3Human GE Ver3.0、8×6K (Agilent) を用いた。GeneSpringGX ver.10.0 (Agilent) により、全遺伝子発現およびNO₂に関連する炎症関連遺伝子として*IL-8*、*ICAM-1*、*MUC5AC*の発現を解析した。

遺伝子発現は平均値±SEMで示した (CAサンプルの中央値を1)。CAに対する有意差は、Dunnettの多重比較により解析し、有意水準を、* : P<0.05, ** : P<0.01, で示した。

3. 結果

3.1 A549を用いたNO₂曝露実験

3.1.1 全遺伝子発現変動

NO₂を曝露したA549の全遺伝子発現の変動を解析した。1、3および6時間のCAを基準とし、同じ時間の各NO₂曝露濃度サンプルの全遺伝子発現をFig. 1に示す。その結果、高濃度で発現変動が大きく、長時間曝露で発現変動が大きかった。

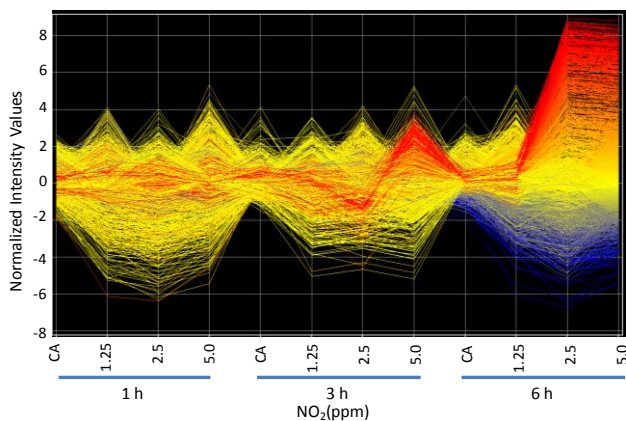


Fig. 1 All gene expression changes in A549 cells exposed to nitrogen dioxide

NO₂曝露による全遺伝子発現比の標準偏差 (SD)、発現亢進/抑制遺伝子数を比較した (Table 1)。SDでは、同じ曝露濃度であれば曝露時間が長いほど、同じ曝露時間であれば曝露濃度が高いほど、大きな値を示す傾向が認められた。6時間の2.5および5.0 ppmなど、値が逆転している場合も認められたが、ほとんど差はなかった。

2倍以上発現が亢進する遺伝子数および半分以下に発現が抑制する遺伝子数についても、曝露濃度が高いほど、曝露時間が長いほど増える傾向が認められたが、SDよりも濃度依存・時間依存性は明確ではなかった。ただし、亢進および抑制遺伝子の総計は、ほぼ曝露濃度・時間依存的であった。

Table 1 Standard deviation (SD) of all gene expression ratio, number of up-regulation and down regulation genes in A549 cells exposed to nitrogen dioxide.

SD	CA	1.25	2.5	5.0
1 h	0.22	0.35	0.46	0.45
3 h	0.20	0.44	0.43	0.57
6 h	0.24	0.48	0.74	0.71

≥2	CA	1.25	2.5	5.0
1 h	550	1014	735	2432
3 h	297	850	1823	1714
6 h	718	2093	1956	2543

≤0.5	CA	1.25	2.5	5.0
1 h	43	478	932	573
3 h	13	1409	432	2323
6 h	24	949	1764	1725

3.1.2 炎症関連遺伝子の発現変動

*IL-8*の遺伝子発現をFig. 2に示す。NO₂の1時間曝露ではCAに対する遺伝子発現の亢進は認められなかった。3時間曝露では5 ppmの濃度で20倍以上の発現亢進が認められた。6時間曝露では2.5 ppmでCAに対して統計学的に有意な遺伝子発現の亢進が認められた。しかし、5.0 ppmでは2.5 ppmよりも発現レベルが低く、明確な濃度依存性は認められなかった。

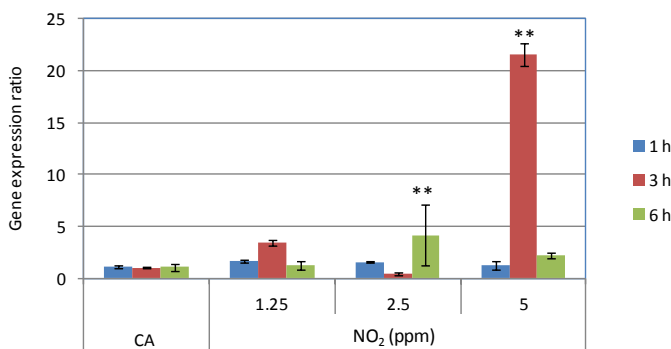


Fig. 2 IL-8 gene expression in A549 cells exposed to nitrogen dioxide.

ICAM-1の遺伝子発現をFig.3に示す. NO₂の1時間曝露では大きな発現亢進は認められなかったが, 2.5および5 ppmでCAに対し統計学的に有意な差が認められた. 3時間曝露では5 ppmの濃度で2.5倍以上の発現亢進が認められた. 6時間曝露では1.25 ppm以上で濃度依存的な遺伝子発現の亢進が認められ, 5.0 ppmでは4倍以上発現が亢進した. それぞれの曝露濃度において, 曝露時間依存的な発現亢進が認められた.

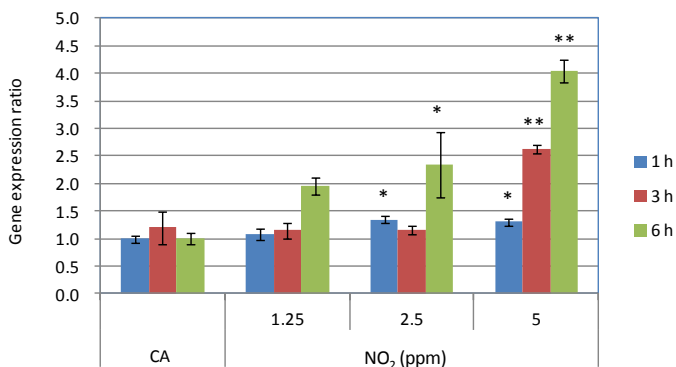


Fig. 3 ICAM-1 gene expression in A549 cells exposed to nitrogen dioxide.

MUC5ACの遺伝子発現をFig.4に示す. NO₂の1時間曝露では変化はなく, 3時間曝露では5 ppm, 6時間曝露では2.5 ppmをピークとする遺伝子発現の亢進が認められ, それぞれCAに対し統計学的に有意な差が得られた. 2.5および5 ppmでは時間依存的な遺伝子発現が認められた.

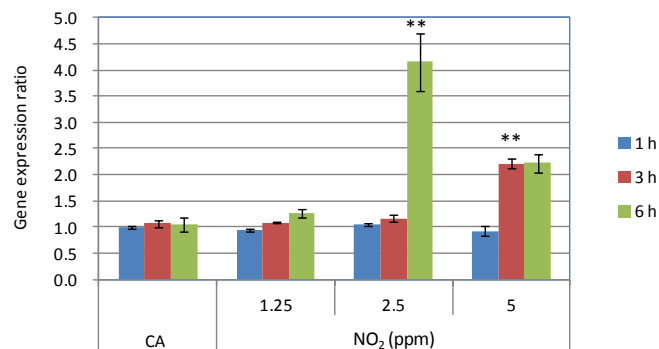


Fig. 4 MUC5AC gene expression in A549 cells exposed to nitrogen dioxide.

3. 2. MucilAir™を用いたNO₂曝露実験

3. 2. 1 全遺伝子発現変動

NO₂を曝露したMucilAir™の全遺伝子発現の変動を解析した (Fig. 5). その結果, 1.25 ppmよりも2.5 ppmの方が発現変動が大きいように見えたが, 5.0 ppmの発現変動は2.5 ppmより小さかった.

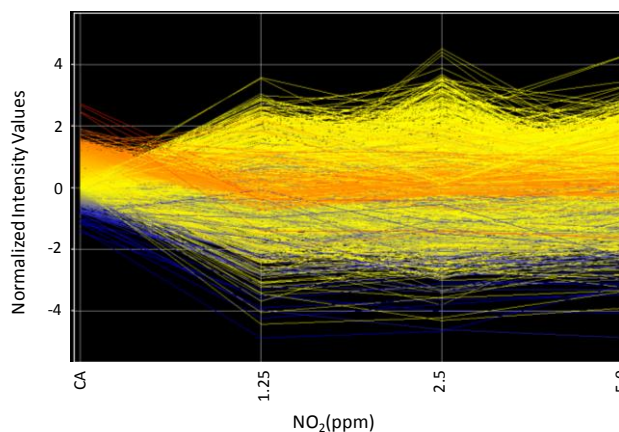


Fig. 5 All gene expression changes in MucilAir™ exposed to nitrogen dioxide

NO₂曝露による全遺伝子発現比のSD, 発現亢進/抑制遺伝子数を比較した (Table 2). いずれも2.5 ppmにおいて最大の値を示し, 濃度依存的な変化が認められなかった. SDと亢進遺伝子数については5 ppmが最小の値を示した.

Table 2 Standard deviation (SD) of all gene expression ratio, number of up-regulation and down regulation genes in MucilAir™ exposed to nitrogen dioxide.

	3 h	CA	1.25	2.5	5.0
SD		0.15	0.50	0.53	0.40
≥2		178	2430	2598	1245
≤0.5		8	861	1686	976

3.2.2 炎症関連遺伝子の発現変動

*IL-8*の遺伝子発現をFig. 6に示す。NO₂の1.25, 2.5 ppmにかけて遺伝子発現が亢進したが、CAに対し、統計学的な有意差は得られなかった。また、5.0 ppmではCAと同じ発現レベルであった。

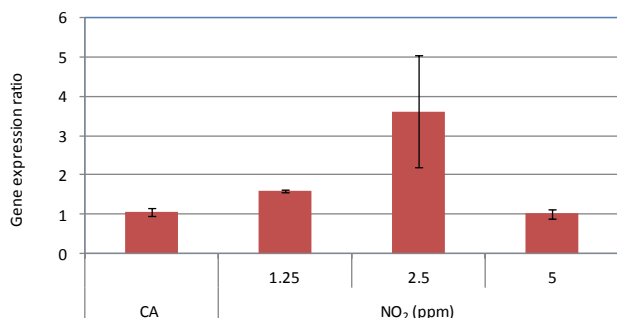


Fig. 6 IL-8 gene expression in MucilAir™ cells exposed to nitrogen dioxide.

*ICAM-1*の遺伝子発現をFig.7に示す。NO₂の1.25, 2.5 ppmにかけて遺伝子発現が亢進したが、CAに対し、統計学的な有意差は得られなかった。また、5.0 ppmではCAと同じ発現レベルであった。

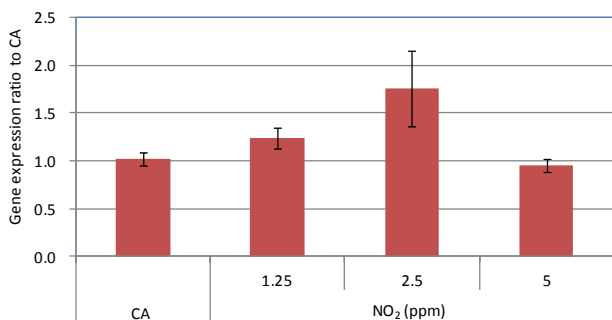


Fig. 7 ICAM-1 gene expression in MucilAir™ cells exposed to nitrogen dioxide.

*MUC5AC*の遺伝子発現をFig.8に示す。NO₂の2.5, 5 ppmでは遺伝子発現に変化は認められなかった。1.25 ppmにおいて統計学的な有意差が認められたが、発現亢進のレベルは弱かった。

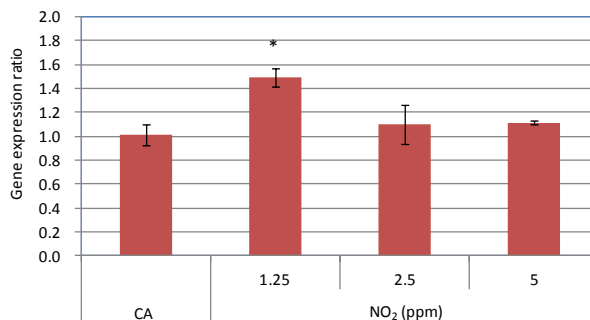


Fig. 8 MUC5AC gene expression in MucilAir™ cells exposed to nitrogen dioxide.

4. 考察

我々がこれまで構築した細胞曝露システムを用い、NO₂をA549に曝露したところ、曝露時間や濃度増加に伴い、多くの遺伝子発現が変動し、また、*ICAM-1*など炎症関連遺伝子発現が亢進した。これらのことから、本細胞曝露システムはA549の炎症応答の評価に利用可能であることが示された。

一方、MucilAir™では今回のNO₂曝露条件（3時間のみ）において曝露濃度依存的な遺伝子発現の変動は認められず、MucilAir™を用いた本細胞曝露システムによる炎症応答評価の有効性を明確に示すには至らなかった。しかし、MucilAir™などの正常細胞は粘液分泌や線毛運動など外来物質に対する防御機能を備えていることから、有害物質による影響が現れにくいことが最近指摘されている。つまり、今回の結果はMucilAir™が低感度であることを意味するのではなく、現実的な影響を反映していると推測される。試験法として高感度化は被験物質の差別化に必須だが、過剰な高感度化は偽陽性の判定に繋がる恐れがある。過大でも過小でもなく、現実的な評価のために正常細胞の活用は不可欠であり、長時間／繰り返し曝露など実験条件を検討することで、現実性と鋭敏性の両方を兼ね備えた評価法を構築する必要がある。

謝辞

本研究についてご討論頂いた京都大学大学院 高野裕久教授、東京大学大学院 酒井康行教授、大阪大学大学院 渡邊肇教授、筑波大学 石井幸雄教授に感謝する。

参考文献

- 1) 田中ら: in vitro 細胞曝露装置における最適な培養環境の探索, JARI Research Journal, 37 巻, 6号 (2013)