

地域マクロニース即応プロジェクト

健康・アンチエイジングプロジェクト

(平成 27 年 4 月より「未病改善食品評価法開発プロジェクト」)

2. 平成 26 年度の研究成果

(1)-1 高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響

自然薯に含まれる主要成分には、ネバネバ成分のムチン、アルギニン酸、コリン、消化酵素であるアミラーゼなどがあり、これらの成分が薬理効果をもたらしていると考えられるが、自然薯自身の生理的機能性については伝承によるものが多く、科学的エビデンスに乏しい。

自然薯のムカゴはポリフェノールを多く含み、*in vitro* で抗酸化能が認められ、生理的機能性を持つ農作物として有力候補であることが示された。本研究では神奈川県産自然薯ムカゴの生理的機能を解析した。機能性の評価はメタボリックシンドロームのモデルとして脂肪負荷による肥満誘導マウスを用いて行った。

4 週間の高脂肪飼料摂取は明らかな肝傷害は呈しないが肝臓の遺伝子発現は変化しており、自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷によって引き起こされるコラーゲン等の細胞外マトリックスの過剰な蓄積による肝障害の発生を遅延させる可能性が示された。

(1)-2 メープルシロップ抽出物の健康機能性評価研究

メープルシロップの組成はスクロース 66.2%、グルコース 0.5%、フルクトース 0.3%、約 30%が水である。そのほかにポリフェノール、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている。この中でもポリフェノールの健康機能性が着目されている。これまで、メープルシロップそのものの健康機能性評価として、メープルシロップ摂取によるラットの肝臓障害緩和作用の可能性を示唆する実験結果を得た。今回の実験ではメープルシロップ（アンバー）を陰イオン交換カラムに供し、主成分である糖をできるだけ除き、ポリフェノール等の微量成分を濃縮した物（MSX）を調製し、その健康機能性の評価を実施した。エネルギー比で脂肪を 10%含む低脂肪食、45%含む高脂肪食、MSX を 0.06%添加した高脂肪食（MSX 食）を 8 週間投与後、ラット肝臓の DNA マイクロアレイ解析を行なった。その結果、MSX 投与は、脂質代謝および免疫応答に関わる遺伝子群の発現を変動させた。高脂肪食摂取により誘導される肝臓の炎症を MSX 摂取により緩和する可能性が考えられた。

(2)-1 桑葉の機能性 — ヒト試験前段階の動物実験

これまで、桑葉摂取がラット血中のトリグリセリド（TG）の上昇を抑制することを明らかにした。桑葉のヒト投与試験を実施する前段階として、実験条件を変更してラットを用いた桑葉の機能性評価解析を実施した。

高脂肪飼料と 1%桑-高脂肪飼料をラットに投与し、血漿中の TG 値を測定したところ、試験開始 22 日および 49 日

後に基礎飼料群に比べ高脂肪飼料群（ $p<0.01$ ）および 1%桑-高脂肪飼料群（ $p<0.05$ ）で有意に高い値を示した。しかし、TG 値は桑添加群と無添加群では有意差は認められなかった。ヒト試験を実施する上で、桑添加にตอบสนองして変化する新たなマーカー分子の探索が必要と考え、以下の実験を実施した。

ラット血液より抽出した mRNA および micro RNA の比較解析を行い、桑葉摂取にตอบสนองする RNA マーカーを抽出した。現在、これら RNA マーカーがヒトにおいても桑摂取に伴う効能・効果のマーカーとなるかの検証を行っている。生物種を超えた共通のマーカーが重要である。

(2)-2 ヒトでの食品機能性評価に向けての取り組み 血球細胞遺伝子発現プロファイル解析による生体内鉄量応答マーカー遺伝子の探索

これまで鉄欠乏・鉄過剰が肝臓に及ぼす影響を網羅的な遺伝子発現解析から明らかにする研究を行い、特に鉄欠乏については「貧血」と「貧血のない鉄欠乏」という 2 段階について報告した。

本プロジェクトでは、DNA マイクロアレイを用いた評価研究の対象を動物からヒトへと展開することも視野に入れている。ヒトの場合、動物と異なり肝臓などの臓器を採取して解析を行うことが難しい。ヒトの体内の細胞の中で比較的少ない負担で採取できるものに血液（血球細胞）がある。血球細胞は、赤血球、白血球、血小板から構成されており、末梢血中の白血球は好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球（T 細胞、B 細胞、NK 細胞など）、単球から構成されている。本研究では、ラット血球細胞を対象とした DNA マイクロアレイ解析を行なった。

本年度は、身体に必須の栄養素である鉄を例とし、鉄量にตอบสนองする血球細胞の遺伝子マーカーの探索に向けて実施した。その結果、鉄の摂取量や摂取期間の違いに対し、血球細胞の遺伝子発現が機敏に反応することが明らかになった。すなわち、生体内の状態を反映するものとして血球細胞の遺伝子マーカーの有効性を示す好例である。さらに、血中分子マーカーについては血球細胞の mRNA だけでなく、血球細胞や臓器由来のマイクロ RNA（miRNA）なども対象となりうるため、マウスを対象とした鉄の実験を実施し、血漿 miRNA の測定を開始した。

(3)-1 エピジェネティクス解析手法のニュートリゲノミクスへの導入

マウスあるいはラットに対して給餌を行い、各臓器における遺伝子の転写の変化を、全ゲノムレベルで網羅的に記録・解析するニュートリゲノミクスにより、食品評価を行っている。一方で、その発現すべき遺伝子の選択過程（遺伝子の発現調節機構）を解明し、それを解析する事で、より精度と再現性が高い評価方法を作り出す事が可能であると期待されている。遺伝子の発現調節は染色体クロマチ

ンと呼ばれる DNA とタンパク質の複合体の性質に依存して生じる事が知られている。この過程は染色体 DNA の配列の変化を伴わない、遺伝子上の変化という事で、エピジェネティクスと呼ばれている。この機構は同時に、その細胞の系列において細胞分裂をまたいで遺伝子の発現状態を維持する機構としても使用されており、この事は世代を挟んだ個体間（すなわち親と子）における遺伝子発現状態の維持の機構にも用いられていると考えられる。

これらの解析が可能になる事で、より効率的で再現性の高い評価方法を開発する事を旨とすると同時に、食から遺伝子発現を通し、健康状態の表現型へとつながる機構（メカニズム）をさらに解明する事を旨とする。

① 分子生物学的エピジェネティクス解析について

エピジェネティクスによる遺伝子の転写調節は主として3つの機構によって行われている。

- 1) DNA のメチル化
- 2) ヒストンの修飾
- 3) 染色体 DNA の立体配座

これらの解析手法のうちどれが効率よく評価に使用できるかは不明である。本研究では、食品の機能性評価に対応できる技術の構築を目指す。

そのために実施する実験技術は以下の通りである。

- ・MDB-seq
- ・ChIP-seq
- ・染色体高次構造解析- 4C あるいは HiC

② 組織学的解析

FISH および ImmunoFISH

(3)-2 エピジェネティック修飾を介して子孫の健康を維持する — 食品ポリフェノールの作用機序の研究

糖質、脂質、アルコールの過剰摂取は代謝系にストレスを与え、肥満や血管系疾患を起こす一要因となっている。最近、このような代謝ストレスがエピゲノムを変化させ、次世代の健康に影響を与えていることが示されつつある。これに対して、レスベラトロールなど一部の食品ポリフェノールにはこのような代謝ストレスを軽減する作用があることが知られている。

我々はアルコール性脂肪肝を誘導した雄マウスと、通常雌マウスを交配した仔は、通常両親の仔に比べて体重が重く、肝トランスクリプトームにも差異が見られることを見いだした。さらにこの差異が、雄親へのレスベラトロールの同時投与で解消されることを確かめた。雄親精子のバイサルファイトシーケンシングを行い、メチロームを解析したところ、対照群、アルコール群、アルコール+レスベラトロール群との間に差異が観察された。本研究は食品ポリフェノールによる代謝ストレスの緩和過程におけるエピゲノム修飾の全体像を理解する基盤となると考えられる。

(4)-1 DNA マイクロアレイ装置の特性の探索

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は、近年そのスクリーニング手法としての有効性から普及が進んでいる。神奈川県産業技術センターでも、オカラ亜臨界水処理物や杜仲葉熱水抽出物の食品としての機能性を検討するため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析を行ってきた。

本研究では、同一の RNA サンプルを異なる2つのプラットフォーム（A 社および B 社装置）で測定した結果を比較し、プラットフォームによる測定結果の特徴を把握することによって、様々な研究課題に対して適切な条件での測定が実施出来るよう基礎的なデータを収集することを目的とした。

その結果、A 社製は中程度の発現の遺伝子を検出しやすいこと、B 社製は低発現の遺伝子の検出率が高いこと、共通して検出された遺伝子は、発現が中程度の遺伝子が多いことが分かった。また、今回は、プラットフォーム間で共通する遺伝子の割合が小さく、プラットフォームの選択が重要であることを示唆する結果となった。ただし、本研究は極めて限定された条件での比較であり、さらに多くのデータの比較検討を行って信頼性を高める必要がある。

(4)-2 発がんプロモーション関連遺伝子の探索

化学物質による発がんリスクを低減させるためには、多段階発がんの機構における発がんプロモーターによる暴露を避け、腫瘍形成を回避することが重要となる。しかしながら、公的に認定された高感度かつ汎用性の高い発がんプロモーション試験法が存在しなかったことから、ほとんどの化合物について、発がんプロモーション活性の評価は行われてこなかった。そこで、大森らは重点基礎研究において、発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験法である Bhas42 細胞形質転換試験法を開発した。

Bhas42 細胞形質転換試験法では、腫瘍細胞で認められる形質を特徴とした形質転換フォーカスの形成をエンドポイントとしているため、精度の高い試験法であると考えられる。しかし、形質転換フォーカスの形成メカニズムについては、報告がほとんど無いことから、Bhas42 細胞形質転換試験法の有用性を提示するためには、メカニズムに関する研究データが不可欠であると考えられる。

本年度は、既知発がんプロモーター（P-1）による経時的な遺伝子発現変動について DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。

既知発がんプロモーター（P-1）処理による経時的な細胞形態の変化、および既知発がんプロモーター（P-1）処理による経時的な遺伝子発現変動を解析し、発がんプロモーションのメカニズム解明に繋がる手がかりを得た。

(4)-3 生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発

本研究の目的は、Bhas42 細胞形質転換試験法について代謝活性化により獲得もしくは増強された化学物質の発

がん性の予測に対応した試験方法を開発する事である。H26年度は、H25年度と同様に Bhas42 細胞形質転換試験系に肝代謝系として加えるヒト肝細胞株の探索とその薬物代謝酵素チトクロム P-450 (CYP)の発現とその活性について検討した。具体的には、ヒト肝がん細胞 HepG2 について、DF5F 培地を用いた培養条件下における薬物代謝酵素 CYP1A1, 1A2, 3A4, 2B6 および 2C9 の細胞内発現およびその活性についての検討を行った。

その結果、HepG2 細胞内における薬物代謝酵素の発現は確認できたが、その活性は非常に低いものであった。一方、CYP 強制発現 HepG2 細胞について同様の検討を行ったところ、DF5F 培地を用いた培養条件下で高い CYP3A4 活性を確認することができた。

(4)-4 DNA マイクロアレイ解析を活用した湘南ゴールドの機能性評価 — 湘南ゴールドの摂取がラット肝臓脂質代謝へ与える影響

‘湘南ゴールド’は神奈川県農業技術センターで育成した柑橘である。‘湘南ゴールド’について、栽培、品質特性、品質保持、非破壊品質評価などの研究を行い、フラボノイド類のナリルチン、ヘスペリジンが主要な機能性成分であることを見いだした。

本研究では、‘湘南ゴールド’を投与した高脂肪食負荷マウスについて解析を行うとともに、肝臓について DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。

その結果、‘湘南ゴールド’を摂取すると、脂質代謝を促進する CYP4A1/A2/A3 及び LPL の発現が増加する傾向にあった。また、高脂肪食摂取による肝臓中遊離脂肪酸量、コレステロール量及びトリグリセリド量の上昇が抑制傾向にあった。

3. まとめ

平成 27 年度より新たな食品表示制度が始まり、従来の特定保健用食品・栄養機能食品以外の加工食品や農林水産物に機能性表示を行うことが可能となった。しかし、これらの表示は企業等の責任により、科学的根拠を元を実施することとされ、最終製品を用いた臨床試験や機能性成分に関するレビュー等が必要とされている。

神奈川科学技術アカデミーでは、機能性食品の生体効果・効能を科学的エビデンスにより評価・検証する本プロジェクトを通して、社会貢献することを目指している。

高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響

篠崎 文夏

1. はじめに

日本産の自然薯 (*Dioscorea japonica*) は古くから滋養強壮などに効果があるとされ食べられてきた。他のヤマノイモ科の植物とは異なり自然薯は皮が薄いため、通常皮ごと食べられる。また、他種よりも強い粘りがあるのが特徴である。

自然薯やナガイモの皮をむき乾燥させたものが「山薬」で生薬の一種に数えられる。山薬の薬理効果としては、血糖降下作用、消化吸収の促進作用、老化防止、抗酸化作用、免疫能増強および男性ホルモン増強作用が挙げられ、漢方薬に調合され利用されている¹⁻³⁾。自然薯に含まれる主要成分には、ネバネバ成分のムチン、アルギニン酸、コリン、消化酵素であるアミラーゼなどがあり、これらの成分が薬理効果をもたらしていると考えられるが、自然薯自身の生理的機能性については伝承によるものが多く、科学的エビデンスに乏しい。

自然薯は通常食べる根の部分の担根体の他に、葉の根元にてできる栄養体であるムカゴも食用である (図1)。どち



図1 自然薯ムカゴ

らも皮ごと食べられ、ムカゴは茹でるもしくは蒸して加熱後に食べる。ムカゴは自然薯担根体よりも利用が少なく、生理的機能性についてはほとんど調べられていない。自然薯担根体の成分と同様の成分がムカゴに存在し、生理的機能が明らかとなれば、ムカゴの利用拡大の一助となると

考えられる。我々はこれまでに神奈川県産の皮ごとの自然薯ムカゴの栄養成分分析を行い、他のヤマノイモ種よりもβカロテンやビタミン K の含有量が高いという特徴があることがわかった。また、自然薯のムカゴはポリフェノールを多く含み、*in vitro* で抗酸化能が認められ、生理的機能性を持つ農作物として有力候補であることが示された。本研究では神奈川県産自然薯ムカゴの生理的機能をさらに調べた。

2. 実験と結果

2.1 実験動物

供試動物はマウス (C57BL6J、オス、3 週齢、チャールスリバー) とした。マウスは床網を敷いたプラスチックケージで一匹ずつ飼育した。飼料および脱イオン水は自由摂取させた。飼育は室温および湿度が調節された環境下で行い、実験期間中の室温は 23°C、湿度 40% であった。明暗期は明期 12 時間 (8:00~20:00)、暗期 12 時間 (20:00~8:00) で飼育を行った。動物実験は実験動物中央研究所の承認を受けて行った。

2.2 実験材料

自然薯ムカゴは 2012 年に神奈川県伊勢原市で生産されたものを使用した。実験に使用したムカゴの一部は株式会社ファームいせはらより提供された。ムカゴは神奈川県農業技術センターの協力により加熱後凍結乾燥を経て微粉末化された。

2.3 実験方法

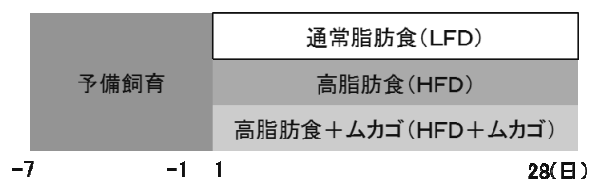


図2 実験スケジュール

機能性の評価はメタボリックシンドロームのモデルとして脂肪負荷による肥満誘導マウスを用いて行った。また、通常ムカゴは加熱して食べることを考慮し、ムカゴの餌に対する添加はαコンスターチと置き換えとした。エネルギー比 45% 高脂肪の餌にムカゴ微粉末を 5% 添加し、高脂肪ムカゴ飼料を作製した。また、コントロールとしてエネルギー比 45% 高脂肪飼料および脂質負荷の効果を計るために通常脂肪飼料を作製した。

マウスは通常脂肪飼料および脱イオン水で一週間馴化し、通常脂肪飼料群、高脂肪飼料群、高脂肪ムカゴ飼料群

の3群に分けた。それぞれの餌で4週間飼育し、解剖した(図2)。解剖は16時間絶食後に行い、血液および肝臓を採取した。血液からは血漿を分離し、生化学成分分析を行った。

肝臓から TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた方法によって Total RNA を抽出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA の精製を行った。さらに Total RNA はバイオアナライザー (Agilent) によって品質の検定を行った。

Total RNA は DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。DNA マイクロアレイは GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて行った。DNA マイクロアレイデータは統計解析言語・環境「R」で正規化した。正規化手法は Distribution Free Weighted method (DFW) とした。正規化したデータを用いて階層的クラスタ解析によって、各群で遺伝子発現の全体的な傾向を調べた。次に、Rank products 法によって False Discovery Rate (FDR) が 0.05 以下で遺伝子発現が変動するプローブセットを抽出し、The Database for Annotation and Integrated Discovery (DAVID) のウェブツールでどのような機能を持った遺伝子が有意に集まっているかを調べるため、Gene Ontology に基づいた Gene functional enrichment analysis を行った。

2.4 実験結果

2.4.1 動物実験

飼育期間内の体重は脂質負荷群で通常脂肪飼料よりも増加した。しかし、高脂肪飼料群と高脂肪ムカゴ飼料群間には差はなかった。また、飼育期間中の摂食量および総摂取エネルギーは通常脂肪飼料群、高脂肪飼料群、高脂肪ムカゴ飼料群の3群間に有意な差はなかった。したがって、脂質負荷群の体重増加は摂取エネルギーの増加によるものではなく、脂質負荷の効果により肥満が誘導されたことが確認された。

2.4.2 血漿生化学成分分析

採取した血液から血漿を分離し、生化学成分分析を行った。4週間飼育後の血中生化学成分は高脂肪飼料群と高脂肪ムカゴ飼料群間では顕著な影響はなかった。高脂肪飼料群は、通常脂肪飼料群よりも肝臓傷害マーカーの一種であるアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) が高くなったが、アルカリホスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) および乳酸脱水素酵素 (LDH) はほとんど変化がなかった。また、有意ではないが高脂肪ムカゴ飼料群では ALT および ALP は通常脂肪飼料群と高脂肪飼料群の中間の値を示した。

2.4.3 DNA マイクロアレイ

肝臓の DNA マイクロアレイデータの階層的クラスタ解析を行ったところ、通常脂肪飼料群、高脂肪飼料群、高脂肪ムカゴ飼料群がそれぞれおおまかな群を形成しており各群で肝臓の遺伝子発現の傾向が異なっていた。

Rank products によって高脂肪飼料群と高脂肪ムカゴ飼

料群を比較し変動プローブセット数を調べた結果、高脂肪ムカゴ飼料群の方が発現上昇したものが 827 個、逆に発現低下したものは 330 個で合計 1157 個であった。これらの変動プローブセットのうち、通常脂肪飼料群と高脂肪飼料群との比較で発現変動したプローブセットと逆に方向に変動したものの、すなわち高脂肪餌の影響を解除したと考えられるプローブセットは高脂肪餌で低下し高脂肪ムカゴ餌で上昇したものが 136、逆に高脂肪餌で上昇し高脂肪ムカゴ餌で低下したものが 94 個あった (表1)。

表1 高脂肪摂取の影響がムカゴ摂取で改善する遺伝子数

通常脂肪群 vs 高脂肪群	高脂肪群 vs 高脂肪 ムカゴ群	遺伝子数
↓	↑	94
↑	↓	136

次に、これらがどのような機能を持つものであるか調べたところ、高脂肪餌で上昇し高脂肪ムカゴ餌で低下したものは細胞外マトリックス、コラーゲン代謝関連であった (表2)。高脂肪餌で低下し高脂肪ムカゴ餌で上昇したものは、酸化還元、脂質代謝および抗アポトーシスに関連するものであった (表3)。また、高脂肪ムカゴ群で高脂肪の影響が改善されていると推察された遺伝子群で濃縮度解析を行ったところ、骨格システム発生、酸化還元、防御応答、コラーゲン代謝、細胞外マトリックス構成および制御関係などが最下層に位置していた (図3)。最下層の GO Term の中でコラーゲン代謝および細胞外マトリックス構成に含まれる遺伝子は高脂肪飼料群で発現上昇したものが高脂肪ムカゴ飼料群で低下したものが占めていた。

表2 高脂肪飼料で遺伝子発現が上昇し、高脂肪ムカゴ飼料で通常脂肪飼料群レベルに戻る遺伝子群のGoTerm_Top 5

GOID	Term	PValue
GO:0030198	extracellular matrix organization	6.70E-09
GO:0043062	extracellular structure organization	2.20E-07
GO:0001501	skeletal system development	3.20E-05
GO:0032963	collagen metabolic process	3.60E-04
GO:0044259	multicellular organismal macromolecule metabolic process	4.00E-04

表3 高脂肪飼料で遺伝子発現が低下、高脂肪ムカゴ飼料で通常脂肪飼料群レベルに戻る遺伝子群のGoTerm_Top 5

GOID	Term	PValue
GO:0055114	oxidation reduction	1.90E-04
GO:0008202	steroid metabolic process	3.50E-03
GO:0006629	lipid metabolic process	8.10E-03
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	8.40E-03
GO:0006637	acyl-CoA metabolic process	9.30E-03

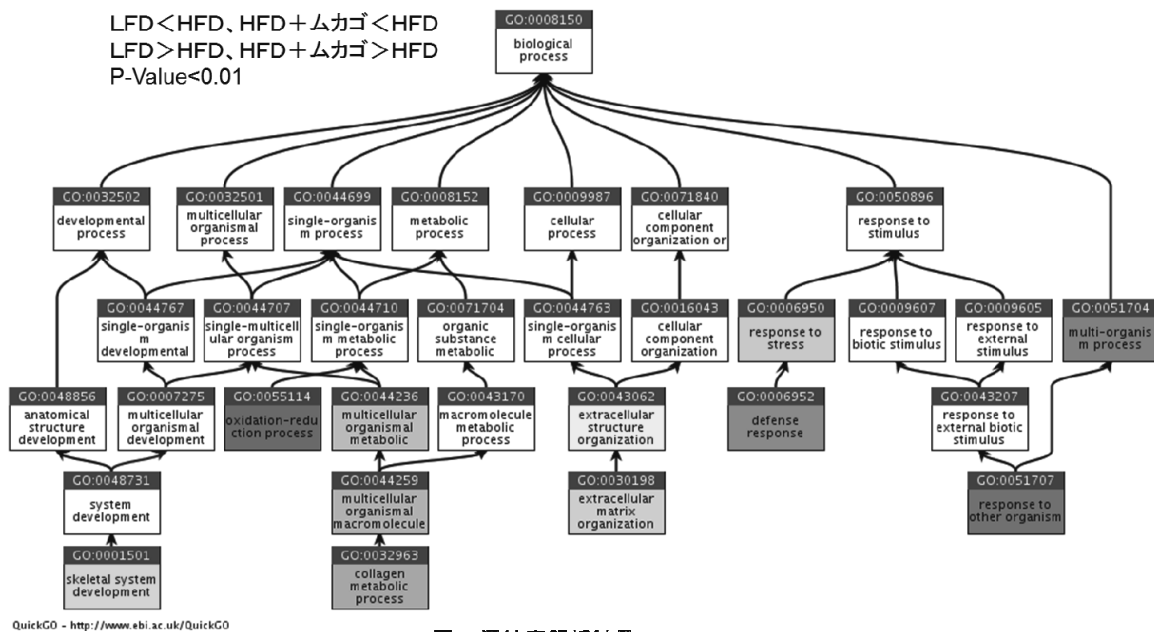


図3 濃縮度解析結果

3. 考察及び今後の展望

生活習慣病を想定した高脂肪負荷による肥満マウスを対象とした動物実験では、血中生化学成分のうち肝傷害マーカーのひとつとして知られる ALT が高脂肪によって上昇する傾向にあり、また、高脂肪ムカゴ摂取群は高脂肪群と通常脂肪群中間値を示していた。このことから、自然薯ムカゴの生理的機能として高脂肪負荷による肝臓障害の軽減が推測された。一方で、肝傷害マーカーの中で AST および LDH はほとんど変化がなく、4 週間の高脂肪飼料摂取の肝臓へのダメージは顕著ではないと考えられた。

DNA マイクロアレイ解析の結果から、高脂肪の影響を受ける遺伝子群のうちムカゴの摂取によって影響が解除されたものは、コラーゲン代謝や細胞外マトリックスに関連するものが多いことがわかった。コラーゲンなどの細胞外マトリックスは細胞骨格、細胞接着の足場や細胞増殖等に重要な役割を担うが、コラーゲン等の過剰な蓄積は肝臓の線維化を招くことが知られている。肝傷害時には筋線維芽細胞様になった活性化肝星細胞が、肝細胞の再生に必要なサイトカインを分泌し肝再生を促進するとともにコラーゲンや TGF- β を産生して肝臓の線維化に関与する。本実験条件の動物は明らかな肝傷害の様相は呈しない正常な状態であると考えられたが、肝臓の遺伝子発現レベルではコラーゲン等の発現上昇などの変化が明確に現れており、4 週間の高脂肪飼料の摂取が肝臓の状態に影響しつつあり、ムカゴ摂取は高脂肪の影響を改善している、もしくは、高脂肪の影響を遅延させると示唆された。

以上の結果から、4 週間の高脂肪飼料摂取は明らかな肝傷害は呈しないが肝臓の遺伝子発現は変化しており、自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷によって引き起こされるコラー

ゲン等の細胞外マトリックスの過剰な蓄積による肝障害の発生を遅延させる可能性が示された。今後はさらに詳細な解析を進めるとともに自然薯ムカゴの機能性成分の分析およびそれらの生理的機能性について解析する予定である。

【参考文献】

1. Jin *et al.*, Food Chem. Toxicol., 48, 3073-3079. (2010)
2. Hashimoto *et al.*, Plant Foods Hum. Nutr., 64, 193-198. (2009)
3. Lin *et al.*, J. Agric. Food Chem., 57, 4606-13. (2009)

メープルシロップ抽出物の健康機能性評価研究

渡部 由貴、亀井 飛鳥

1. 背景

メープルシロップはサトウカエデなどの樹液を濃縮した甘味料で、世界シェアの約 8 割がカナダ産のものである。メープルシロップにはグレードが存在する。収穫時期が早く、光透過率の高いものからエキストラライト、ライト、ミディアム、アンバー、ダークの 5 段階に格付けされている⁽¹⁾ (図 1)。それぞれ、色や香りが少しずつ異なる。いずれのグレードであってもメープルシロップは日常的に使用される甘味料である。

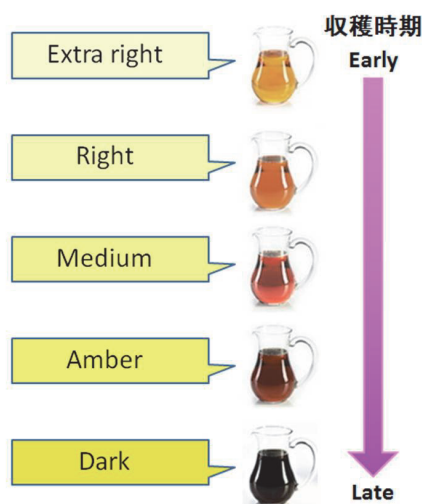


図 1. メープルシロップのグレード

メープルシロップの組成はスクロース 66.2%、グルコース 0.5%、フルクトース 0.3%、約 30%が水である。そのほかにポリフェノール^(2, 3, 4)、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている。本研究室では、この微量成分の健康機能性に着目した。我々は 2008 年から 2010 年まで、メープルシロップそのものの健康機能性評価を行い、メープルシロップ摂取によるラットの肝臓障害緩和作用の可能性を示唆する実験結果を得た⁽⁵⁾。今回の実験ではメープルシロップのグレードの中でも、日本で菓子などによくつかわれているアンバーを用いた。このメープルシロップを陰イオン交換カラムに通し、主成分である糖をできるだけ除き、ポリフェノール等の微量成分を濃縮したものを調製し、その健康機能性の評価を実施した⁽⁶⁾。

2. 方法と結果

2-1. 方法

2-1-1. 動物飼育

エネルギー比で脂肪を 10%含む低脂肪食、45%含む高脂肪食、MSX を 0.06%添加した高脂肪食 (MSX 食) を作成した。C57BL/6J 雄性マウス 3 週齢を、環境順化のため 7 日間の飼育後、3 群 (n = 10) に分け、それぞれに低脂肪食、高脂肪食、MSX 食を 8 週間与え、16 時間絶食後に解剖を行った。体重増加や総摂取エネルギー量などの 3 群間の統計的な差は Tukey によって検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。また、解剖時に採取した肝臓を、DNA マイクロアレイに供した。

2-1-2. DNA マイクロアレイ実験

解剖時に採取した肝臓(n = 7)から、total RNA を抽出後、Affymetrix 社の定法に従って調製した。DNA マイクロアレイは、約 4 万の遺伝子情報が搭載されている Gene Chip® Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。得られた画像データ (CEL files) を、「R」(<http://cran.r-project.org/>) を用いて Distribution Free Weighted method (DFW) のアルゴリズムにて正規化し、Rank products にて低脂肪食群と高脂肪食群、高脂肪食群と MSX 食群のそれぞれ 2 群間比較を行った。false discovery rate(FDR) < 0.01 の条件下で変動プローブセットを抽出し、さらに低脂肪食群に対して高脂肪食で起こる変化を MSX 摂取が改善する変化を示すプローブセットに絞り込んだ。絞り込んだプローブセットについて DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の Functional Annotation Tool を用いて Gene Ontology および KEGG pathway に基づく遺伝子機能の濃縮度解析を行った

2-2. 結果

2-2-1. 生化学データ解析

低脂肪食群、高脂肪食群、MSX 食群の 3 群間で総摂取エネルギー量に差はなかった。このことからマウスは MSX 入りの餌を忌避せず食べることがわかった。一方、体重、血中中性脂肪、肝臓中コレステロール量が低脂肪食群に比べて高脂肪食群で有意に高い結果であったが、MSX 摂取により血中中性脂肪や肝臓中コレステロール量の変化は認められなかった (表 1)。

2-2-2. DNA マイクロアレイ解析

Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の濃縮度解析を行った結果、脂質代謝および免疫応答の関連遺伝子の濃縮度が高いことが明らかになった。また、KEGG pathway に基づく解析によっても不飽和脂肪酸合成に関与する遺伝子の濃縮度が高く、Gene Ontology に基づく解析結果と一致する結果であった。

脂質代謝については、脂肪酸の伸長や不飽和化に関わる acyl-CoA thioesterases(Acot2 and Acot3) 、

stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (Scd1)、fatty acid desaturases (Fads1 and Fads2)、ELOVL family member 6, elongation of long-chain fatty acids (yeast) (Elovl6)が高脂肪食で発現低下し、MSX摂取により増加していた。

表1 体重、肝臓重量、血漿中および肝臓中生化学データ

	LFD	HFD	MSX
Final body weight (g)	29.01 ± 0.70 ^a	32.66 ± 1.31 ^b	31.88 ± 0.72 ^{ab}
Body weight gain (g)	13.18 ± 0.85 ^a	16.46 ± 0.99 ^b	15.90 ± 0.57 ^{ab}
Liver weight (g)	1.113 ± 0.032	0.998 ± 0.104	1.058 ± 0.025
Serum biochemical parameters			
Triacylglycerol (mg/dL)	25.75 ± 7.95 ^a	71.60 ± 9.08 ^b	73.2 ± 10.38 ^{ab}
Total cholesterol (mg/dL)	124.3 ± 4.2	147.2 ± 7.5	145.2 ± 7.1
Glucose (mg/dL)	177.5 ± 16.8	185.0 ± 14.1	188.0 ± 8.3
Glycoalbumin (%)	3.14 ± 0.17	3.54 ± 0.07	3.43 ± 0.12
Hepatic biochemical parameters			
Triacylglycerol (mg/g wet liver)	79.30 ± 12.02	93.5 ± 13.97	76.36 ± 4.41
Total cholesterol (mg/g wet liver)	4.08 ± 0.19 ^a	2.79 ± 0.19 ^b	2.66 ± 0.07 ^{ab}

LFD: 低脂肪食群 (n = 8)、HFD: 高脂肪食群 (n = 10)、MSX: MSX群 (n = 10)。数値は mean ± SEM で示した。異符号間に有意差あり (p < 0.05)

また、免疫応答遺伝子については、guanylatebinding protein family (Gbp1, Gbp2, Gbp3, Gbp6, Gbp7)、immunity-related GTPase family M member 1 (Irgm1)、2' -5' oligoadenylate synthetase-like 1 (Oasl1)といった感染防御関連遺伝子、chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (Cxcl9)、chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (Cxcl11)、immunity-related GTPase family M member 1 (Irgm1) といった炎症関連遺伝子が高脂肪食摂取で増加、MSX摂取で低下していた。さらに、上記GO termには含まれないものの炎症のマーカーであるserum amyloid A 1, 2, and 3 (Saa1, Saa2, Saa3)、orosomucoid 2 (Orm2)が高脂肪食により増加し、MSX摂取により低下していた。

3. 考察

本研究では、メープルシロップの健康機能性を明らかにするため、メープルシロップからの抽出物である MSX 摂取が高脂肪食摂取に及ぼす影響を評価した。

肝臓における脂質代謝および免疫応答が MSX 摂取により改善されることが明らかになった。脂肪酸代謝では、脂肪酸の不飽和化と伸長に関与する遺伝子発現増加が見出された。脂肪酸の不飽和化は、中性脂肪 (TG) 合成を促進する反応でもあるが、本実験では血中、肝臓の TG 量が MSX 摂取で増加することはなかった。ここから、これらの遺伝子発現変化は、TG 合成ではなく、むしろ細胞毒性の強い飽和脂肪酸を減らすことに寄与していると考えられた。また、免疫応答遺伝子の変化は、MSX 摂取による

炎症の抑制を示唆するものであった。

以上より、高脂肪食摂取により誘導される肝臓の炎症を MSX 摂取により緩和する可能性が考えられた。

このプロジェクトは、ケベック・メープル製品生産者協会 (FPAQ) も参加しているプログラム「セクター開発への分野別開発戦略コンポーネント 1」を通じた、ケベック州農業・漁業・食品省 (MAPAQ)の援助によるものです。

This project was supported by Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation of Quebec (MAPAQ) through «Soutien aux strategies sectorielles de développement Volet 1: Appui au développement sectorial» program with the participation of the Federation of Quebec Maple Syrup Producers.

【参考文献】

1. Perkins TD, van den Berg AK. *Adv Food Nutr. Res.*, 56, 101-143. 2009
2. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.*, 58, 11673-11679. 2010
3. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.*, 59, 7708-7716. 2011
4. Li L, Seeram NP. *J Funct Foods.* 3, 125-128. 2011
5. Watanabe Y, Kamei A, Shinozaki F, Ishijima T, Iida K, Nakai Y, Arai S, Abe K. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75, 2408-2410. 2011
6. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Kondo T, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Abe K. *Biosci Biotechnol Biochem.* In press

桑葉の機能性—ヒト試験前段階の動物実験

宮澤 眞紀（神奈川県衛生研究所）、小林 征洋（東京海洋大学）

1. はじめに

生活習慣病の予防として機能性食品が注目されているが、科学的に有効性が証明されている食品は多くない。機能性食品の有効性を証明するためには、ヒトでの臨床試験が必須であるが、その前に動物を用いた投与実験を行い、安全性や有効性についての情報を得ることが望ましい。

以前我々は、桑葉がラットにおいて血中トリグリセリド (TG) の上昇を抑制することを明らかにした¹。桑葉がヒトにおいても同様の効果を有するか確認するためにヒト投与試験を実施するに当たり、ヒトへの投与量等の条件を明らかにするため、ラットを用いた桑葉の投与実験を実施したので、その結果について報告する。

2. 実験と結果

2. 1 実験動物および飼料

動物は、8週齢の雄性 SPF ラット Wistar ST（日本エスエルシー）30匹を1週間基礎飼料（CE-2；日本クレア）で予備飼育した後実験に用いた。試験期間中、動物には基礎飼料（3.46 kcal/g）、粉末化した高脂肪飼料（Quick Fat；日本クレア）（4.08 kcal/g）及び1%乾燥桑葉粉末添加高脂肪飼料（1%桑-高脂肪飼料）（4.04 kcal/g）を給餌した。

2. 2 実験方法

高脂肪飼料と1%桑-高脂肪飼料の摂食量に差がないことを予備試験で確認した後、本実験を行った。基礎飼料群、高脂肪飼料群および1%桑-高脂肪飼料群の動物数は各10匹とし、血中TGおよび体重の平均値が等しくなるように群分けを行った。飼料は自由摂取とし、毎日動物の状態を観察し、摂餌量の測定および飼料の交換を行った。

体重測定は、週に1回実施した。また、試験開始から22日、35日及び49日後に1晩絶食させた後に尾静脈よ

り採血し、血漿についてTGを測定した。試験開始8週後に1晩絶食させた後に頸静脈より採血し、解剖を行った。血液の一部をRNA抽出用に分取し、血漿については、血液生化学検査を行った。また、肝臓および精巣から精管周囲にかけての腹腔内脂肪組織を採材して重量を測定後、検体を採取した。

2. 3 結果

2. 3. 1 摂餌量

試験開始から55日間の総摂取カロリー量に有意差は認められなかった。1%桑-高脂肪飼料群を高脂肪飼料群と比較すると、総飼料摂取量は99.1%であり、総摂取カロリー量は98.2%であった（表1）。また、55日間の平均桑粉末摂取量は、0.53g/kg体重/日であった。

2. 3. 2 一般状態、体重及び臓器重量

試験期間中、各群とも順調な体重増加が認められ、一般症状に異常は見られなかった。体重は、試験開始3週間後から両高脂肪群が基礎飼料群より有意に増加し、以後試験終了までこの傾向が持続した。解剖時の肝臓重量体重比は各群間でほぼ等しく、有意差は認められなかった。腹腔内脂肪組織重量体重比は、基礎飼料群より両高脂肪飼料群が有意に増加（ $p < 0.01$ ）していた（表1）。

2. 3. 3 血漿中の生化学検査

尾静脈血中のTG値は、試験開始22日および49日後に基礎飼料群に比べ高脂肪飼料群（ $p < 0.01$ ）および1%桑-高脂肪飼料群（ $p < 0.05$ ）で有意に高い値を示した。TG値の変化を図1に示した。解剖時に採血した頸静脈血の血液生化学検査の結果、アラニンアミノトランスフェラーゼ値において、高脂肪飼料群が基礎飼料群より有意に高かった（ $p < 0.05$ ）以外、有意な差は認められなかった。

表1 解剖前日までの総摂取カロリー量および体重並びに解剖時における臓器重量体重比

	総摂取カロリー量 (kcal/g)	体重 (g)	肝重量体重比 (%)	脂肪重量体重比 (%)
基礎飼料群	4335 ± 213	418.9 ± 14.8	2.68 ± 0.16	0.67 ± 0.10
高脂肪飼料群	4597 ± 275	454.5 ± 23.8**	2.63 ± 0.12	0.89 ± 0.07**
1%桑-高脂肪飼料群	4557 ± 254	450.3 ± 17.8**	2.59 ± 0.15	0.96 ± 0.11**

平均値±標準偏差

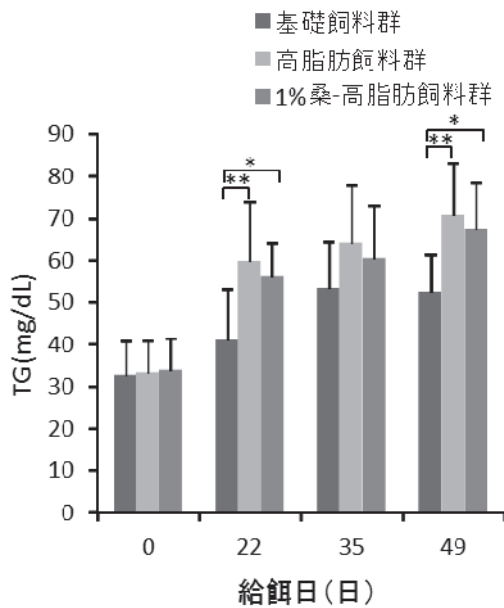


図1 尾静脈血中のTGの変化
*P<0.05, **p<0.01

3. 考察及び今後の展望

ラットへの8週間の1%桑-高脂肪飼料の投与試験を実施した。その結果、投与3週後から基本飼料投与群に比べ体重及び血中TG値が有意に増加していた。桑を含まない高脂肪飼料投与群と比較すると、有意差はないが血中TG値はやや低い値であった。1%桑-高脂肪飼料は高脂肪飼料群に比べ総カロリー摂取量が低かった(98.2%)ことから、TG値が低かった可能性がある。しかし、腹腔内脂肪重量体重比は1%桑-高脂肪飼料群が最も高かった。

以前我々は、高脂肪飼料給与ラットに対し、7週間の桑葉乾燥粉末の強制経口投与実験¹を行い、高脂肪群に比べ有意に血中TGが低下し、肝臓のトランスクトーム解析の結果、脂肪酸のβ酸化、α酸化およびω酸化が亢進したこと明らかにした。前回の実験では、桑葉乾燥粉末を500mg/kg体重/日で強制投与した場合に最も血中TGの上昇抑制効果がみられた、これに相当する桑葉粉末量を飼料に添加した。今回の実験における桑乾燥粉末の平均摂取量は0.53 ± 0.21 g/kg体重/日であり前回の実験における投与量とほぼ同じであったが、血中TGは高脂肪飼料群との間で有意差は認められなかった。前回と異なる桑葉乾燥粉末を用いたことや、投与方法に違いがあることなどの条件の違いから、血中TGの上昇抑制効果が明確に認められなかった可能性が示唆された。前回の実験では血中遊離脂肪酸の上昇抑制も認められていることから、今後血中遊離脂肪酸についても確認する必要がある。また、DNAマイクロアレイ用試料も採取していることから網羅的遺伝子発現解析も合わせて行いたい。

平成27年度より新たな食品表示制度が始まり、従来の特定保健用食品や栄養機能食品以外の加工食品や農林水産物に機能性表示を行うことが可能となった。しかし、こ

れらの表示は企業等の責任により、科学的根拠を元を実施することとされ、最終製品を用いた臨床試験や機能性成分に関するレビュー等が必要とされている。

今後は上記のデータを精査してヒト臨床試験を実施する計画である。本試験では、このヒト臨床試験に向けて、食品摂取に応答して変化する新たなマーカー分子の探索を行った。ヒト臨床試験では、食品の機能性評価の解析対象は血液、尿等に限られる。血液には、一般的な生化学パラメータの他、micro RNAや、血球細胞由来のmRNAが含まれるが、これらは食品摂取に迅速に応答して変化すると期待される。そこで、ラット血液より抽出したmRNAおよびmicro RNAの比較解析を行い、桑葉摂取に応答するRNAマーカーの抽出を行った。これらRNAマーカーの生物種を超えた共通性を明らかにすることも、ヒト臨床試験での検証課題の一つである。ヒトでの機能性食品の評価方法を検討するとともに、機能性食品の機能性・安全性評価法の確立を目指す。

【参考文献】

1. Y. Kobayashi, M. Miyazawa, A. Kamei, K. Abe, T. Kojima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2385(2010).

ヒトでの食品機能性評価に向けての取り組み

血球細胞遺伝子発現プロファイル解析による

生体内鉄量応答マーカー遺伝子の探索

亀井 飛鳥

1. はじめに

鉄はマイクロ栄養素の1つであり、酸素の運搬担体として、また様々な酵素の補欠分子として、生体機能を正常に保つために必須のミネラルである。鉄は摂取量の低下などによって欠乏した状態が続くと、やがて貧血に至る。一方で、過剰に蓄積すると貯蔵臓器に酸化ダメージを与えることが知られている。すなわち、鉄が欠乏状態、過剰状態のいずれの場合にも、身体はダメージを受ける。

鉄の摂取量が低下することで起こる鉄欠乏や、鉄の過剰摂取が身体に及ぼす影響についての研究はこれまでに多く実施されている。しかし、様々な代謝系や細胞機能への影響を網羅的に解析した報告はほとんどない。つまり、鉄欠乏や鉄過剰状態において、これまで着目されていない代謝系や細胞機能においても変化が起こっている可能性がある。鉄の摂取量が低下すること、また摂取量が過剰になることの安全性を評価するためには、この未解明の代謝系や細胞機能の変化も含めた総合的な解析が必須であると考えられる。そこで我々は、鉄欠乏あるいは過剰状態での生体内変化を総合的に評価することにした(図1)。総合評価の手法として、DNAマイクロアレイを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析を採用した。

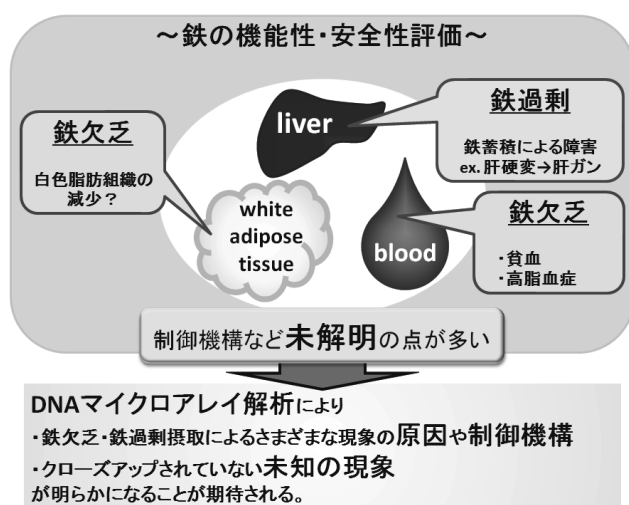


図1 鉄の機能性・安全性評価について

1. 1 鉄欠乏の生理作用

摂取量の低下や臓器からの出血などにより鉄が欠乏すると、まず、肝臓などの臓器に貯蔵されている鉄が優先的に利用され、減少する。これに応答し、血清中のTIBC(総鉄結合能)が増加し、フェリチンが減少するが、ヘモグロビンは正常値を保ったままである。この状態を「貧血のない鉄欠乏」とよぶ。一方、この鉄欠乏状態が続くと、貯蔵鉄の減少に引き続いて血中のヘモグロビン量が低下し、「貧血」に至る(鉄欠乏性貧血)。

鉄欠乏性貧血時には、血清や肝臓の脂質プロファイルに変動があることが報告されており、鉄欠乏により、高脂血症を発症する可能性を示唆する結果や、血清中の中性脂肪、リン脂質、LDL+VLDL コレステロール量、肝臓で総脂質、中性脂肪、リン脂質量が増加する結果が報告されている

(1)。しかしこれらの変化は、飼育条件によって異なる結果となっており、その機構について十分な情報が得られているとは言い難い。また、鉄欠乏により、ミネラルバランスが変動し(2)、これによって脂質過酸化が亢進し、ダメージを与えることが示されている(2、3)。このように、鉄欠乏時には、鉄貯蔵の中心臓器である肝臓において、様々な代謝変動が起こり得る。

1. 2 鉄過剰の生理作用

鉄は、小腸における吸収が厳密に制御されているため、過剰に経口摂取した場合には、その多くが吸収されずに排泄される。一方、一旦吸収されると、積極的に排除する機構が存在しないため、肝臓などの臓器内に蓄積されていく。臓器に蓄積する鉄の多くは、フェリチンタンパクと結合して安定な状態で存在するが、一部はタンパク質と結合しない不安定鉄(自由鉄)として存在する。不安定鉄は、Fenton反応によりヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスを誘導し、臓器にダメージを与える。鉄が過剰になると、この不安定鉄が増し、種々の臓器不全を引き起こす。C型肝炎などの肝疾患においても肝臓内鉄過剰蓄積が認められ、肝硬変、肝がんのリスクファクターのひとつとなる。鉄過剰は、上記のような疾患や鉄剤の過剰摂取のほか、輸血などによっても引き起こされる。

1. 3 DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

生命現象を、タンパク質合成のセントラルドグマにおける流れから解釈すると、遺伝子 DNA はその生物固有の情報を持ち、この遺伝子 DNA を転写した mRNA (トランスクリプト) を翻訳してタンパク質 (プロテイン) が作られる。タンパク質が酵素であれば、代謝産物 (メタボライト) が生成されることになる。それぞれの群を特に、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームと呼ぶ (図 2)。

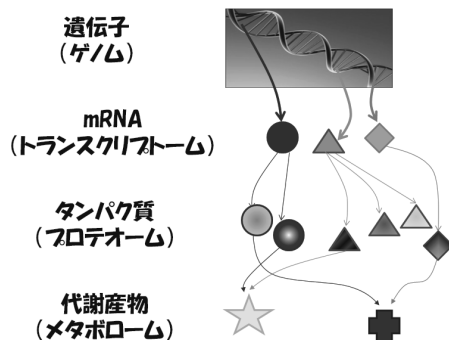


図 2 セントラルドグマ

生体内で起こる変化を多角的に解析する手法として、網羅性の高い DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析がある。これは、細胞内で発現する数万種の転写産物 (mRNA) 量を網羅的に解析するもので、mRNA 量の変化の内容を解読することで、これから起こる生体の変化を予測しようという手法である。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析は、ニュートリゲノミクス (栄養ゲノム科学) の観点から食品や食品成分の健康機能性評価 (4-8) や、栄養素欠乏の安全性評価 (9) に広く活用されている。

鉄欠乏時の生体内の変化のトランスクリプトーム解析として、鉄の吸収活性の高い十二指腸や空腸をターゲットとした報告はあるが (10, 11)、肝臓に関する報告はない。一方、食餌性鉄過剰が身体に及ぼす影響について、脳 (12)、心臓や筋肉 (13) を対象にした網羅的な遺伝子発現解析の報告はあるが、鉄の主要貯蔵臓器である肝臓を対象とした研究報告はなかった。そこで我々は、鉄欠乏・鉄過剰が肝臓に及ぼす影響を網羅的な遺伝子発現解析から明らかにする研究を行い、特に鉄欠乏については「貧血」と「貧血のない鉄欠乏」という 2 段階について報告した (14, 16)。

1. 4 血球細胞

本プロジェクトでは、DNA マイクロアレイを用いた評価研究の対象を動物からヒトへと展開することも視野に入れている。ヒトの場合、動物と異なり肝臓などの臓器を採取して解析を行うことが難しい。ヒトの体内の細胞の中で比較的少ない負担で採取できるものに血液 (血球細胞) がある。血球細胞は、赤血球、白血球、血小板から構成されており、末梢血中の白血球は好中球、好酸球、好塩基球、

リンパ球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞など)、単球から構成されている。血球細胞を対象とした DNA マイクロアレイ解析は、これら全ての細胞を対象としている。

我々はこれまで肝臓を対象とした解析を行い、栄養素の過不足や食品成分の摂取が生体に及ぼす影響を解析した。この結果をヒトに応用するための試みとして、動物の血球細胞の網羅的遺伝子発現解析に着手することにした。これは、動物が食品や栄養素を摂取したときの肝臓の遺伝子発現変化を踏まえ、「肝臓でこのような変化が起きているとき、血球細胞の遺伝子発現はこのように応答する」という情報を得ることが目的である。このような動物の情報を集積することで生体の変化に応答する血球細胞のバイオマーカー遺伝子を明らかにしてリスト化する。ヒトが食品や栄養素を摂取したときの血球細胞の変動遺伝子をバイオマーカー遺伝子リストに照合して肝臓の応答を予測することができるになれば、ヒトにおける食品・栄養素の機能性・安全性評価への応用が期待される。

2. 実験と結果

2. 1 鉄過剰食摂取 9 日

鉄は小腸における吸収の制御によって体内への取り込み量が制御されている。日本においては、食事から鉄を過剰に摂取することは稀であり、これまでの鉄過剰に焦点を当てた研究は、C 型肝炎などの病態における肝臓への鉄過剰蓄積に関するものが主であった。現在、サプリメント剤などの普及により、容易に鉄の補給が可能となっていることを考慮すると、食事からの鉄過剰摂取が身体に及ぼす影響について、検証しておくことは必須であると考えた。そこで、通常の 10 倍の鉄を添加した食餌を与える実験を行い、鉄過剰食摂取開始 9 日目の血液の遺伝子発現解析を行った。

2. 1. 1 方法

a) 動物実験

3 週齢の雄性 SD ラットを 4 日間の予備飼育の後、AIN93G 食 (鉄含量 48 ppm) を与える通常食群 (n = 8)、AIN93G 食に鉄を添加した食餌 (鉄含量 500 ppm) を与える鉄過剰食群 (n = 9) の 2 群に分けた。各群、自由摂食、自由飲水とした。実験食摂取開始後 8 日目の夜から 16 時間絶食の後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血し、全血の一部を RNA 抽出用に、残りからは血清あるいは血漿を採取した。血清および血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差を Student's *t*-test により確認し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。血液より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は全個体を対象に実施した。

得られたデータ (CEL データ) に対し、採用する正規化 (summarization, normalization) 手法の検討を行い、DFW にて正規化を行ったデータを解析に採用した。

2. 1. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2 群間で体重、摂食量に差は認められなかった。血清 TIBC の有意な降下および血中フェリチン、血清鉄の有意な上昇が認められた。

b) DNA マイクロアレイ実験

階層的クラスタ解析の結果、通常食群の 5 個体でひとつのクラスターを形成するものの、2 群間で明確に異なるクラスターを形成することはなかった (図 3)。

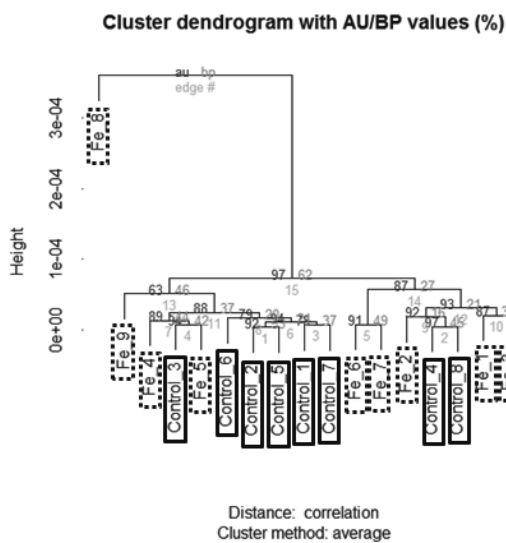


図 3 鉄過剰食群および通常食群の血液 DNA マイクロアレイデータの階層的クラスタ解析結果
Control: 通常食群, Fe: 鉄過剰食群

2. 2 鉄欠乏食摂取 3 日

1. 1 に記載したように、出血や摂取不足によって鉄が欠乏すると「臓器貯蔵鉄の減少」という段階を経て「貧血」に至る。すなわち、鉄不足によってもたらされる症状には「貧血のない鉄欠乏」と「鉄欠乏性貧血」とが存在する。その発生頻度については、日本人女性の約 4 割が「貧血のない鉄欠乏」、約 1 割が「鉄欠乏性貧血」といわれている (15)。我々はこれまで、「貧血」および「貧血のない鉄欠乏」時の評価として、肝臓を対象とした遺伝子発現解析を実施し、報告した (14, 16)。まずは遺伝子発現解析のヒトへの応用を目指し、日本人女性でより頻度の高い「貧血のない鉄欠乏」の評価のために、短期間の鉄欠乏食摂取が血液に及ぼす影響のトランスクリプトーム解析を実施した。

2. 2. 1 方法

a) 動物実験

3 週齢の雄性 SD ラットを約 1 週間の予備飼育後、2.

1 と同様に通常食群 (n = 8)、鉄欠乏食群 (n = 9) の 2 群に分け、通常食群は鉄欠乏食群に対して Pair-feeding させた。予備飼育 4 日目より 9 時~17 時の 8 時間制限給餌を開始し、実験食摂取期間中も時間制限給餌を継続した。実験食摂取開始後 3 日目に、1.5 時間の摂食後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血し、全血の一部を RNA 抽出用に、残りからは血清および血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差を Student's t-test により確認し、P < 0.05 を統計的に有意であると判断した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。肝臓より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は各群 n = 8 にて実施した。

得られたデータ (CEL データ) に対し、採用する正規化 (summarization, normalization) 手法の検討を行い、DFW にて正規化を行ったデータを解析に採用した。

2. 2. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2 群間で体重差は認められなかった。血中成分のうち、鉄欠乏食摂取開始 3 日目の生体は、ヘモグロビン量に差がなく、TIBC (総鉄結合能) の有意な上昇、血清フェリチン、血清鉄量の有意な降下が認められ、「貧血のない鉄欠乏」であることが明らかになった。

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスタ解析の結果、2 群間で 2 つの異なるクラスターを形成することが明らかになった (図 4)。

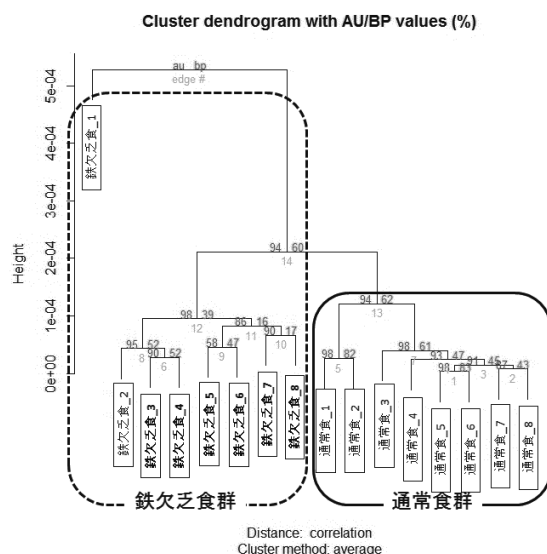


図 4 短期間の鉄欠乏食群および通常食群の血液 DNA マイクロアレイデータの階層的クラスタ解析結果

このことから、2 群間の血液における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。この条件下の肝臓においては、階層的クラスター解析の結果、2 群間の差は血液ほど明確ではなく (16)、ここから、鉄の欠乏への遺伝子発現レベルでの応答は肝臓よりも血液のほうが速く、かつ明確であることが明らかになった。

2. 3 鉄欠乏食摂取 17 日

2. 2 では、日本人女性の約 4 割を占めると言われる貧血のない鉄欠乏についての血球細胞遺伝子発現解析を行った。続いて、重篤な鉄欠乏の結果である貧血についての評価を行った。

2. 3. 1 方法

a) 動物実験

3 週齢の雄性 SD ラットを約 1 週間の予備飼育の後、2 群に分け、それぞれ異なる食餌 (実験食と総称) を摂取させた。成長期のげっ歯類用の標準調製飼料である AIN93G 食および AIN93G から鉄 (クエン酸鉄) のみを除去した鉄欠乏食である。AIN93G 食 (鉄含量 48 ppm) を与える群を通常食群 (n = 5)、鉄欠乏食 (鉄含量 3 ppm 未満) を与える群を鉄欠乏食群 (n = 6) とした。なお、鉄欠乏食群は通常食群に比べて摂取量が低下することから、摂取エネルギーや他の栄養素の摂取量の違いの影響を除くために、通常食群は鉄欠乏食群の前日平均摂取量を摂取させた (Pair-feeding の実施)。飼育環境は 8 時~20 時を明期とする 12 時間明暗サイクルとし、気温は 23 ± 1° C、湿度は 45 ± 2% にて制御した。実験食摂取開始後 13 日目より 9 時~17 時の 8 時間制限給餌を開始し、17 日目に 1.5 時間の摂食後、麻酔下にて解剖を行い、頸動脈より採血後、肝臓を摘出した。血液からは血清あるいは血漿を採取した。血清あるいは血漿、さらに肝臓の一部を用いて成分分析を行った。体重および成分分析結果の統計的な差を Student' s t-test により確認し、P < 0.05 を統計的に有意であると判断した。また、肝臓より TRIzol Reagent (Life Technologies 社) の定法に従って total RNA を抽出した。

b) DNA マイクロアレイ実験

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。血液より抽出した total RNA は、Affymetrix 社の定法に従って DNA マイクロアレイ用に調製し、データを取得した。なお、DNA マイクロアレイ実験は全個体を対象に実施した。

得られたデータ (CEL データ) に対し、採用する正規化 (summarization, normalization) 手法の検討を行い、DFW にて正規化を行ったデータを解析に採用した。

2. 3. 2 結果

a) 飼育期間中の体重、血中、肝臓中成分の変化

飼育期間中、2 群間で体重差は認められなかった。血中のヘモグロビン量の測定を実施したところ、実験食摂取開

始から徐々に鉄欠乏食群における値が低下し始めた。実験食開始 17 日目の生体は、ヘモグロビン濃度が通常の 40% 程度にまで低下した、いわゆる「鉄欠乏性貧血」の状態であった。なお、TIBC (総鉄結合能) の有意な上昇、血清鉄量、肝臓中铁量の有意な降下が認められ、鉄欠乏状態であることを裏付ける結果となった。

b) DNA マイクロアレイ実験データ

階層的クラスター解析の結果、2 群間で 2 つの異なるクラスターを形成することが明らかになった (図 5)。このことから、2 群間の血液における遺伝子発現パターンが異なることが示唆された。

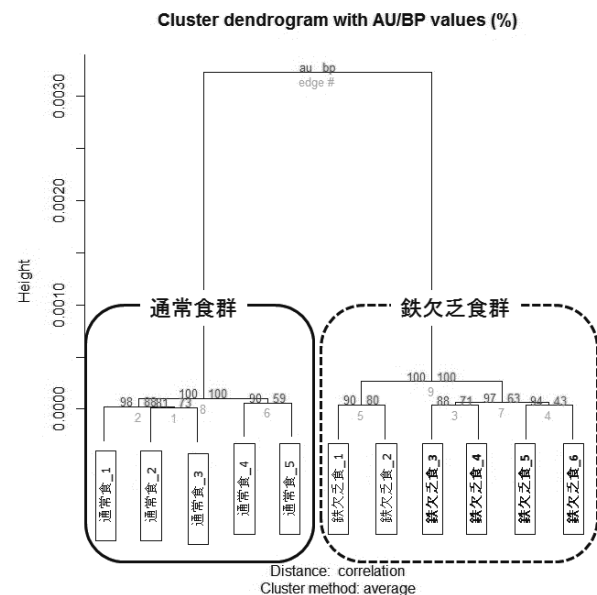


図 5 鉄欠乏食群および通常食群の血液 DNA マイクロアレイデータの階層的クラスター解析結果

2. 4 鉄量応答マーカー遺伝子のリスト化

上記 2. 1 ~ 2. 3 にて取得した鉄過剰・貧血のない鉄欠乏・貧血時の血球細胞 DNA マイクロアレイデータにおいて、変動した遺伝子は「体内の鉄量に反応して変動する遺伝子」とも定義される。遺伝子発現のパターンによって分類することで、体内鉄量応答遺伝子マーカーをリスト化した (図 6)。すなわち、貧血・貧血のない鉄欠乏で共通の変動が鉄過剰で逆転しているものについては「体内の鉄量のわずかな変化にも応答するマーカー」、貧血の変化が鉄過剰で逆転しており、貧血のない鉄欠乏では変化のないものについては「体内の鉄量の大きな変化に反応するマーカー」とした。さらに、抽出条件を変えた上で、さらに正規化手法を変えて発現変動倍率の大きさについての制限も加えたものをリスト化したものについては、体内の鉄量応答遺伝子マーカーとして特許出願をした。

	貧血	貧血のない鉄欠乏	鉄過剰	Probe set数 (gene nameあるもののみ) (FDR < 0.05)
体内の鉄量の わずかな 変化にも応答	↑	↑	↓	58
	↓	↓	↑	15
体内の鉄量の 大きな 変化に応答	↑	→	↓	146
	↓	→	↑	45

図6 体内の鉄量に応答する血球細胞遺伝子マーカー

2. 5 鉄量応答マーカー遺伝子リストの精査

上記はいずれもラット血球にて実施した解析結果であるが、今後の展望として、ヒトへの応用を考慮している。マーカー分子としての活用には生物種の違いを考慮する必要がある。そこで、マウスを対象として同様の実験を行い、ラット、マウスに共通のマーカー遺伝子を抽出した。

3. 考察及び今後の展望

本研究より、体内の鉄量の変化に応答して血球細胞の遺伝子発現が変動することが明らかになった。この応答は、鉄の貯蔵臓器である肝臓に比べて同等あるいはそれ以上にはやく、とくに欠乏時の応答は顕著であった。ここから、体内の鉄量を調べるためのマーカーとして、血球細胞の遺伝子発現変化が利用できることが示された。

現在、体内の鉄量のマーカーとして、血中ヘモグロビン、血清フェリチン、TIBC、血清鉄などがあるが、一般的な健康診断や人間ドックの測定項目にはヘモグロビンや赤血球数、ヘマトクリット値はあるものの、血清フェリチン、TIBC、血清鉄は含まれていない。貧血のない鉄欠乏はヘモグロビンに差が生じないため、一般的な健康診断や人間ドックでは見落とされる。冒頭にも記載したが、日本人女性の約4割が貧血を伴わない鉄欠乏状態であるといわれているが、日常生活を送る中でこの潜在的な鉄欠乏状態は見逃される。既報のように(16)、貧血のない鉄欠乏であっても肝臓の遺伝子発現が変動すること、それが様々な代謝変動の引き金となる可能性が見出されており、健康に及ぼす影響は少なくない。そのため、これからは貧血のない鉄欠乏かどうかの診断も必要になると考えられる。現在、貧血のない鉄欠乏を診断するためのマーカー分子である血清フェリチンやTIBC、血清鉄などの測定には時間、コストがかかる。一方、血球細胞で鉄量に応答して発現変動する数種の遺伝子マーカーを活用すれば、体内の鉄量について、その程度も含め、より簡便かつ迅速に診断することが可能となる。

鉄過剰については、日本においてはC型肝炎等の疾病以外で生じることは稀であるが、近年のサプリメント市場の拡大を考慮すると、これからは鉄の過剰摂取の可能性にも着目する必要がある。日本における鉄摂取の推奨量は、年齢、性別により異なるが、成人男性で10mg、女性で12mg

である。これに対し、摂取量の上限は約4倍の40mgとされている。今回行った実験では、通常食の10倍の鉄過剰食を摂取させたが、今後、鉄所要量を通常の5倍、2.5倍と段階的に減らしながら鉄過剰食摂取の影響を観察し、鉄過剰摂取の安全性を評価することが課題だと考えている。また、貧血時に処方される鉄剤は1日当たり50~210mgと多量であることを考慮し、貧血時の鉄過剰摂取の安全性評価を実施することも重要である。

本研究は、身体に必須の栄養素である鉄を例とし、鉄量に応答する血球細胞の遺伝子マーカーの探索に向けて実施したものである。その結果、鉄の摂取量や摂取期間の違いに対し、血球細胞の遺伝子発現が機敏に反応することが明らかになった。すなわち、生体内の状態を反映するものとして血球細胞の遺伝子マーカーの有効性を示す好例である。さらに、血中分子マーカーについては血球細胞のmRNAだけでなく、血球細胞や臓器由来のマイクロRNA(miRNA)なども対象となりうるため、マウスを対象とした鉄の実験を実施し、血漿miRNAの測定を開始した。今後、データを蓄積し、食品・栄養素の機能性評価のための分子マーカーとしてのmiRNAの有効性について評価を行う。また、食品・栄養素の機能性評価としてこれまで遺伝子発現(mRNA)の変化を網羅的に解析する手法(トランスクリプトーム)をとってきたが、より総合的な解釈を進めるためには代謝産物の網羅的な解析(メタボローム)とトランスクリプトームとを合わせた総合的な解析(統合オミクス)も有効である。さらにトランスクリプトームについても、DNAマイクロアレイを用いた評価に加え、新たに次世代シーケンサーを用いた、より網羅性の高い評価方法の導入も有効だと考える。このような背景から、統合オミクス解析や次世代シーケンサー解析にも着手した。今後はデータの蓄積を行い、食品機能の体系的な評価系の構築を目指す。

本研究は、鉄の機能性評価に加え、①モデル動物からヒトへの評価方法の展開、②習熟した手法を生かして食品・栄養素の機能性・安全性の評価センターの構築に向けたモデルスタディでもある。今後、条件や素材を変えてさらなるデータ蓄積を行い、上記展開に向けての基盤づくりを行う。

【参考文献】

1. Sherman A. R. et al. *J Nutr.* **108**:152-62 (1978)
2. Uehara M. et al. *J Nutr Biochem.* **8**:385-391 (1997)
3. Knutson M. D. et al. *J Nutr.* **130**:621-628 (2000)
4. Kobayashi Y. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:2385-2395 (2010)
5. Oda Y. et al. *BioFactors.* (2010) in press
6. Kondo S. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**:1656-1661 (2010)
7. Fukasawa, T. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**:7007-7012 (2010)
8. Yao, R. et al. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 2168-2173

- (2010)
9. Endo Y. et al., *J Nutr.* **132**:3632-3637 (2002)
 10. Collins J. F. *Biol Res.* **39**:25-37 (2006)
 11. Collins J. F. et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **288**:G964 (2005)
 12. Johnstone D. et al. *Neurochem Int.* **56**:856-863 (2010)
 13. Rodriguez A. et al. *BMC Genomics.* **8**:379 (2007)
 14. Kamei A. et al. *Physiol Genomics* **42**:149-156 (2010)
 15. 日本鉄バイオサイエンス学会 治療指針作成委員会編, 鉄材の適正使用による貧血治療指針, (2009)
 16. Kamei A. et al. *PLoS ONE* **8**:e65732 (2013)

エピジェネティクス解析手法のニュートリゲノミクス

への導入

近藤 隆、近藤 香

1. はじめに

動物は、その体を構成する、全細胞一つ一つに1セットの完全な遺伝子のセットを持っている。しかしながら全ての細胞で全ての遺伝子セットが機能している訳ではない。ある遺伝子の組み合わせが選択され、その機能を発現する事により、それぞれの細胞、あるいは細胞により構成されている臓器の性質は決定される。その機能の発現は遺伝子をRNAに変換する事で実現する。これを転写という。現在、我々は、マウスあるいはラットに対して給餌をおこない、各臓器における遺伝子の転写の変化を、全ゲノムレベルで網羅的に記録・解析する事で、食品評価を行っている。一方で、その発現すべき遺伝子の選択過程（遺伝子の発現調節機構）を解明し、それを解析する事で、より精度と再現性が高い評価方法を作り出す事が可能であると期待されている。遺伝子の発現調節は染色体クロマチンと呼ばれるDNAとタンパク質の複合体の性質に依存して生じる事が知られている。この過程は染色体DNAの配列の変化を伴わない、遺伝子上の変化という事で、エピジェネティクスと呼ばれている。この機構は同時に、その細胞の系列において細胞分裂をまたいで遺伝子の発現状態を維持する機構としても使用されており、この事は世代を挟んだ個体間（すなわち親と子）における遺伝子発現状態の維持の機構にも用いられていると考えられている。これらの解析を可能になる事で、より効率的で再現性の高い評価方法を開発する事を目指すと同時に、食から遺伝子発現を通し、健康状態の表現型へとつながる機構（メカニズム）をさらに解明する事を目指す。

2. 実験と結果

2.1 分子生物学的エピジェネティクス解析について

この分野は、技術的にも、知見的にも日進月歩であり、激しく進歩している。したがって技術導入と並行して、細かい変化も含めて、常に新しい手法を取り入れていく必要が有る。

転写に大きく影響を与える染色体上の変化であるエピジェネティクス変化には幾つかの種類が存在しているが、現在、本研究室では2つの機構についての解析の導入が終了し、これらに関して解析が可能になった。

- 1) DNAのメチル化 (1)。とくに CpG という配列における C 塩基 (シトシン残基) のメチル化 (5mC) は遺伝子発現を抑制する事が知られている。また、このメチル化は水酸基を付与され、ヒドロキシメチルへと変化し (5hmC)、さらにフォルミルメチルカルボキシメチルをへて通常の C へと戻る。この過程において、ヒドロキシメチル C 以降の C 誘導体は、特にエンハンサー部分における転写状態の活性化状態に対応していると考えられている。
- 2) ヒストンの修飾 (2)。ヒストンはリン酸化、メチル化、アセチル化、ユビキチン化などの様々な修飾を受ける。これらの修飾ヒストンのうち、遺伝子の転写状態に大きく寄与しているのはメチル化、アセチル化、およびユビキチン化ヒストンである。また、これらの修飾はヒストンのアミノ酸配列のうちリジン、アルギニン、ヒスチジンに生じるが、このうち複数のリジン残基のメチル化、アセチル化、ユビキチン化が転写発現調節に影響する事が知られている。特に、ヒストン H3 では 9 番目と 27 番目のリジンがメチル化されると転写が抑制され、4 番目のリジンのメチル化で転写が活性化される事が知られており、27 番目のリジンがセチル化される事でエンハンサーが活性化されると考えられている。
- 3) 染色体 DNA の立体配座 (3)。遺伝子の発現はエンハンサー・サイレンサー等のシス転写調節配列の機能に依存している。これらの配列がプロモーターに直接働きかける事が重要であるが、これらの配列は塩基配列上プロモーターの近傍に存在するとは限らない。多くのシス転写調節領域はプロモーターから非常に遠くに存在しており、これらの配列の機能発現には、これらの配列をプロモーターの立体的な近傍に持ってくる必要が有る。これは、新たなエピジェネティクスの分野であると考えられており、現時点において、この機構については全く判明していないが、いくつかの解析方法は既に確立しており、その導入を行う。

いずれの場合においてもこれらの現象が遺伝子の発現の変化をもたらす直接的な原因となっているため、遺伝子発現変化より早く反応が現れ、データが明確化される可能性がある。

2. 1. 1 MDB-seq と ChIP-seq

DNA のメチル化の解析には主として二つの方法を用いる。一つはバイサルファイト法 (bisulfite) といい、これを、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した方法をバイサルファイト-セック (bisulfite-seq) という。本方法は、非常に詳細で確実なデータを得る事ができるが、その解析には、全ゲノム配列を複数回カバーして読む必要があり、膨大なデータと膨大な費用を要する。また、解析自体に困難が伴うため、効率的ではない。さらにこの方法では現在のところメチル化Cとヒドロキシメチル化Cの区別ができないという欠点もある。一方で、クロマチンタンパク質である MDB1 あるいは MDB2 の DNA 結合特異性を用い、これらのタンパク質の DNA 結合ドメインである cxxc ボックスを用いて、ゲノムからこれらの認識配列であるメチル化 CpG (meCpG) を濃縮する方法が有る。当研究室においては、この方法を利用した MDB-seq という手法の導入を行い、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析の導入を行っている (4)。安岡研究員ポリフェノールにおける研究で既に実践を始めている。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) は DNA に結合している特定のタンパク質に対して免疫沈降を行い、そのタンパク質が結合している DNA 配列をゲノムから濃縮する方法である。その濃縮された配列を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した方法を ChIP-seq と呼ぶ。ChIP を行う対象となるタンパク質はいわゆるエピジェネティクス解析の対象となる修飾ヒストンのみならず、通常の転写調節因子群も対象にできる (5)。ことに、ポリフェノールを多く扱う我々にとって重要な一群の転写因子群は CAR, RAR, PPAR, RXR, ER 等のステロイドレセプターファミリーである。これらの手法は既に我々の様々な実験に用いており、現在安岡研究員の研究に導入を始めている。今後亀井研究員、篠崎研究員らの研究においても応用を進めていく予定である。

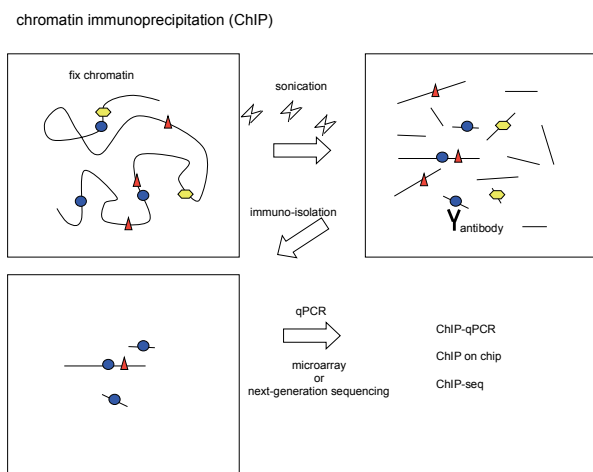


図 1、ChIP の手法。生細胞をホルマリンでクロスリンクし、タンパク質群と DNA を固定する。超音波で破碎後、特定のタンパク質を認識する抗体 (ここでは青い丸を認識する抗体) で免疫沈降し、その後、クロスリンクを解き、qPCR、次世代シーケンサー等で回収された DNA 断片を調べる。

2. 1. 2 染色体高次構造解析-4C あるいは HiC

染色体は一本の巨大な DNA 分子であるが、直線的な構造ではなく核の中で折り畳まれており、一次構造上では遠くに離れている染色体領域でも立体配座上では近い場合も有る。これらの三次構造は偶然に決定されている輪ではなく、遺伝子発現調節のために厳密に調節されているものも存在する。クロマチン構造解析 (chromatin conformation capture) は分子生物学的、生化学的にこれを解析する手法で、複雑な操作を要する技法である。一つのプロモーター領域が相互作用している配列を網羅的に同定する方法を 4C と呼び、染色体全域において全ての相互作用を同定する方法を HiC という (3)。通常いずれの場合においても次世代シーケンサーを用いて解析を行う。HiC に関しては、バイサルファイトシーケンシング法と同様、データ処理が非常に複雑になり困難であるが、解析すべき領域の選定に今後幾つかの例で行っていく必要は有るかと考えている。導入に関しては現在準備中である。4C-seq に関しては現在手法の確立を目指して努力を行っている。

2. 2 組織学的解析

上記の分子生物学的解析に対し補完的な解析として組織学的な解析を行っている。主として組織切片に対し、遺伝子の発現を検討する in situ hybridization、免疫組織染色 (IHC) を行っているが (6)、エピジェネティクス解析の一環として DNA FISH (fluorescent in situ hybridization)、immunoFISH (immunohistochemistry and DNA FISH) 等の手法を用いて分子生物学的解析の補完作業を行っている (5)。

2. 3 食品因子による転写調節機構の解析

レチノイン酸はビタミン A として知られ、その他のポリフェノール群と同様に、いわゆる核内レセプターを介して遺伝子の発現変化をもたらす事が知られている食品成分の一つである。現在、そのレチノイン酸を用いた遺伝子の発現調節の機構に関してプロモーターとエンハンサーの相関、エンハンサーの活性化等を中心にその機構の解析を行っている。

3. 考察及び今後の展望

2つの技術に関しては導入、確立を果たし、実働が可能な状態になっている。今後はこれらの技術を使用し、食品評価の実際の応用展開を始めている。また、これらの結果を抽出する事で、原因から結果への、より入口の部分で生じている事が判明すると同時に、食の機能解析へ貢献していくことを期待している。今後効率的な手法を確立するためには、実例を蓄積する必要があると考えている。それらの蓄積により、将来的にはより効率的なスクリーニング方法へとつながる可能性もあると考えている。

【参考文献】

1. L.G. Acevedo, A. Sanz and M.A. Jelinek, *Epigenomics*, 3, 93 (2011).
2. N.R. Rose and R.J. Klose, *Biochem. Biophys. Acta.*, pii: S1874-9399(14)00028-5. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.007. [Epub ahead of print] (2014).
3. J.Dekker, *Nat.Methods*, 3, 17 (2006).
4. M.T. Zhao, J.J. Whyte, G.M. Hopkins, M.D. Kirk and R.S. Prather, *Cell Reprogram.*, 16, 175 (2014).
5. T. Kondo, K. Isono, K. Kondo, T.A. Endo, S. Itoharu, M. Vidal and H. Koseki, *Dev. Cell*, 28, 94 (2014)
6. A. Kamei, Y. Watanabe, K. Kondo, S. Okada, F. Shinozaki, T. Ishijima, Y. Nakai, T. Kondo, S. Arai and K. Abe, *PLoS ONE*, 8, e65732 (2013).

エピジェネティック修飾を介して子孫の健康を維持する 食品ポリフェノールの作用機序の研究

安岡 顕人

1. はじめに

母親の栄養状態が出生児の代謝や成長に影響することは知られている。一方で父親の栄養状態が子に影響することも疫学的に証明されている。後者の場合、精子を介したエピジェネティックな機構の寄与が大きいことが予想される。2010年に、低タンパク質条件で飼育した雄マウスの仔は通常食で飼育した雄マウスの子に対して脂質やコレステロールの代謝が変化し、PPAR 遺伝子上流のメチル化も変動しているという報告、高脂肪食で飼育した雄マウスの仔は、対照群と比較してグルコース耐性障害が加齢と共に悪化するという報告がなされている。しかし、このようなエピジェネティックな子孫への影響を、食品非栄養成分によって軽減するような研究は十分なされていない。

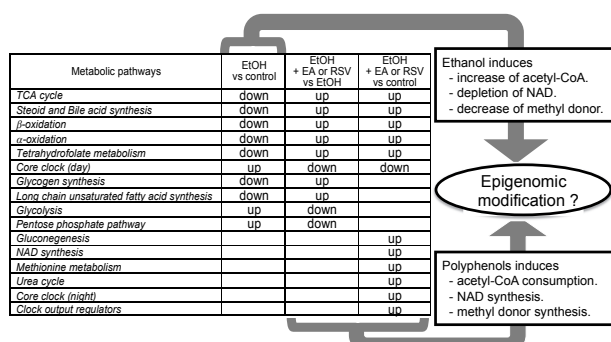


図1 トランスクリプトーム解析から予想された食品ポリフェノールの抗代謝ストレス効果
EtOH: エタノール投与群、EtOH + EA or RSV: エタノールにエラグ酸あるいはレスベラトロールを加えた投与群。

我々は核受容体 CAR を介した食品ポリフェノールの作用について研究を行ってきた。CAR のポリフェノール応答性を培養細胞を用いて検討し、5,7 位に水酸基を持つフラボン類(クリシンなど)やエピカテキンにより活性化されることを見いだした。マウスの肝臓でもクリシンは CAR 依存的に p450 遺伝子の発現を誘導した(文献1)。酒類に含まれるエラグ酸やレスベラトロールによっても CAR は活性化された(文献2)。次にマウスのアルコール脂肪肝モデルに対するエラグ酸やレスベラトロールの効果を調べたところ、投与したマウスでは脂肪肝が抑制され、脂肪蓄積やメチル基供与系や NAD 合成系といったエピゲノム修飾に関係するような肝臓トランスクリプトームの変動が抑制されていた。CAR 欠損マウスではこのような効果は観察されなかった(文献3、図1)。以上の研究により、遺伝子制御を介した食品ポリフェノールの代謝改善効果に関する

確証と、エピゲノム修飾に関する示唆が得られたため、以下の研究を行った。

1. 1 本研究の概要

糖質、脂質、アルコールの過剰摂取は代謝系にストレスを与え、肥満や血管系疾患を起こす一要因となっている。最近、このような代謝ストレスがエピゲノムを変化させ、次世代の健康に影響を与えていることが示されつつある。これに対して、レスベラトロールなど一部の食品ポリフェノールにはこのような代謝ストレスを軽減する作用があることが知られている。我々はアルコール性脂肪肝を誘導した雄マウスと、通常の雌マウスを交配した仔は、通常両親の仔に比べて体重が重く、肝トランスクリプトームにも差異が見られることを見いだした。さらにこの差異が、雄親へのレスベラトロールの同時投与で解消されることを確かめた。雄親精子のバイサルファイトシーケンシングを行い、メチロームを解析したところ、対照群、アルコール群、アルコール+レスベラトロール群との間に差異が観察された。本研究は食品ポリフェノールによる代謝ストレスの緩和過程におけるエピゲノム修飾の全体像を理解する基盤となると考えられる。

1. 2 材料と方法

1. 2. 1 試薬等

RNeasy Mini Kit は QIAGEN 社 (Tokyo, Japan)、GeneChip® 3' IVT Express Kit と GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array は Affymetrix-Japan 社 (Tokyo, Japan) より購入した。アルコール性脂肪肝研究用飼料、液体餌専用給餌器とマウスケージはオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。

1. 2. 2 動物飼育

6 週齢の C3H/HeN 雄マウス (n=6) は温度 (25°C) ・光線の照射時間 (8:00-20:00 (day)、20:00-8:00 (night)) ・湿度 (35%~40%) を調節したケージに飼い、一週間環境に慣れさせた。この間に、CE-2 餌 (埼玉実験動物) と水を自由に摂取させた。マウスの飼養と実験手順は National Institutes of Health の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に従った。2 群ずつ、コントロール食あるいはエタノール食 (5%)、コントロール食あるいはエタノール食 (5%) + レスベラトロール (73mg/L) を 5 週間投与し

た直後に通常の C3H/HeN 雌マウスと交配させた。生まれた仔マウスを離乳期 3 週齢から 25 週齢まで飼育し、順次解剖した。

1. 2. 3 バイサルファイトシークエンシング

雄親より遊走精子を採取し、ジチオトレイトールを終濃度 0.2M になるように加えた後、NucleoSpin Tissue (TAKARA 社) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) を用いてゲノム DNA の濃度測定を行い、各個体のサンプルが均等になるように混合し、Post-Bisulfite Adaptor Tagging 法によるバイサルファイト処理及びシークエンス用の鋳型調整を行った。バイサルファイト処理後の鋳型を用いて、cBOT を用いてフローセル上に結合させたライブラリーをブリッジ PCR により増幅し、次世代シークエンサー HiSeq2000 による全ゲノムシークエンスを行った。得られたデータは Fastq 形式に変換し、以降の解析に供した。シークエンス生データの 3' 側から 7 bp 切断と 5' 側から 5 bp 切断したものについて、ソフトウェア Bismark を用い、リファレンスゲノム (University of California Santa Cruz, mm10) に対してマッピングを行った後、ソフトウェア Bismark methylation extractor を用いて、各群のメチレーション部位のデータを得た。

1. 2. 4 メチレーションデータ処理

メチレーションデータの処理には、統計解析言語環境 R (<http://www.r-project.org/>) で Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) のパッケージ BiSeq を用いた。「各 CpG 間の距離が 100 bp 以内でかつ、CpG site が 20 個以上連なっている領域」を CpG cluster の定義とした。リード数の偏りによる影響を除くためリード数 9 以上の部分を除いた。平均のリード数は 3.5 であった。その後、各 CpG site のメチレーションレベルをメチル化シトシン (ウラシルに変異していないシトシン) / 全リード数として計算した。各群間の二群間比較を行い、DMRs のデータ (開始部位、終了部位、各群のメチレーションレベル) を得た。Benjamini and Heller の多重比較検定を用いて、メチレーションレベルの平均値が 0.3 以上異なっている部位を DMRs として抽出した。site 間の距離が 100 bp 以内で同方向の変動をしていた CpG site は cluster とした。逆方向の変動をしているものがあった場合は cluster としなかった。転写制御と関連する DMRs の選択については、UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) より得たマウスゲノムの転写開始点 (TSS) のデータと Affymetrix 社より得たアノテーションを Ensembl を用いて統合し、アノテーションが付いたプローブセットの TSS データを得た。TSS 上流 500 bp について DMRs を持つプローブセットを抽出した。このプローブセットと、仔の肝臓における発現変動プローブセットを比較した。

2. 結果と考察

2. 1 雄親へのエタノールとレスベラトロール投与が仔に与える影響

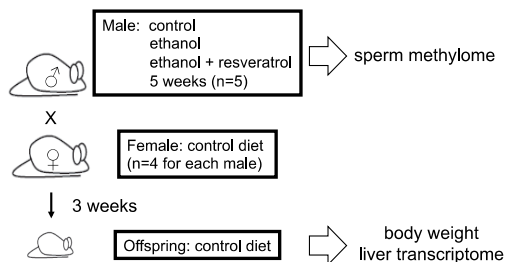


図2 マウスの二世代飼育実験のデザイン

図 2 に 2 世代飼育実験の概要を示す。離乳期 3 週齢から 25 週齢の仔の体重を測定したところ、離乳期 3 週齢仔マウスにおいて、エタノール (E) 群の体重はコントロール (C) 群と比べて有意に増加したが、エタノール+レスベラトロール (ER) 群の体重に有意な差は見られなかった (図 3)。

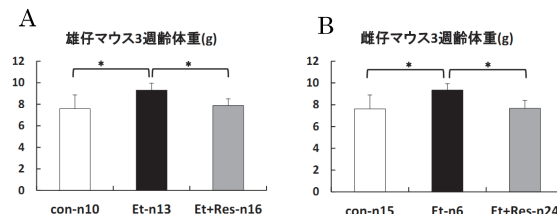


図3 雄親がエタノールあるいはエタノール+レスベラトロールを摂取した3週齢雄仔マウス(A)と雌仔マウス(B)の平均体重

血中総コレステロール (T-CHO) と中性脂肪 (TG) については、E 群は C 群と比べて TG 値が有意に高かったが、ER 群に有意な差は見られなかった (図 4)。以上より、3 週齢仔の体重と TG 値に対して、親へのエタノール投与は増加させる効果があり、レスベラトロールの添加によりこれが抑制されることが明らかになった。

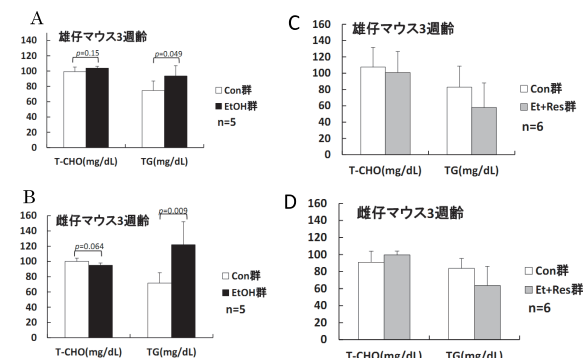


図4 雄親がエタノールあるいはエタノール+レスベラトロールを摂取した3週齢雄仔マウス(A, C)と雌仔マウス(B, D)の総コレステロール(T-CHO)と中性脂肪濃度(TG) P値はWelchのt検定。

次にこれらの仔の肝臓の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。DFW 法 (Distribution Free Weighted method) で標準化して階層的クラスタリングを行ったところ、C 群と E 群は雄雌それぞれにおいて別々のクラスターとして分類された (図 5)。

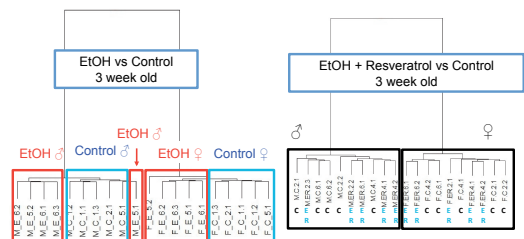


図5 雄親がエタノールあるいはエタノール+レスベラトロールを摂取した仔の肝臓トランスクリプトーム

DFW法で標準化したデータを採用し、rankproduct法を用いてC群とE群間、C群とER群間で雄と雌それぞれについて二群比較を行い、FDR (False Discovery Rate) < 0.05となるプローブセットを抽出した。発現量がC群<E群のプローブセットは雄雌共通で530であり、C群>E群のプローブセットは雄雌共通で479であった。発現量がC群<ER群のプローブセットは雄雌共通で392であり、C群>ER群のプローブセットは雄雌共通で265であった。さらにこれらを比較したところ、発現量がC群<E群であった530のうちC群<ER群でなかったもの(ERで回復したものは)は485、C群>E群であった479のうちC群>ER群でなかったもの(ERで回復したものは)は445であった。以上より、雄親へのエタノール投与は仔の肝臓トランスクリプトームを変動させ、レスベラトロールの添加はこの変化の大部分を解消することが明らかになった。

2.2 雄親精子のエピゲノム情報と仔肝臓トランスクリプトームとの相関性の検討

雄親精子ゲノム上のDMRの総数は、メチル化がC群<E群であったものが91991個、C群>E群が69748個、E群<ER群が87105個、E群>ER群が88935個、C群<ER群が92710個、C群>ER群が71956個であった。

メチル化が転写制御に関わっている場合、転写開始点上流500bp(TSS-500bp)にメチル化変動が生ずることが多い。各群間でSS-500bpにおける変動を検討したところ、C群<E群であった部位の35%、C群>E群であった部位の73%について、ER群では逆向きのメチル化変動が生じていた。一般にTSS-500bpのメチル化は遺伝子を抑制すると考えられている。例えば、発現量A<Bに対してメチル化程度A>Bというパターンが予想される。発現仔の肝臓の変動遺伝子について、親精子のメチル化変動との相関性を検討した。その結果、仔の肝臓でレスベラトロール添加で回復がみられたプローブセットC<E回復485とC>E回復445について、それぞれのメチル化変動は表1のようであった。これより、C<E回復485については予想と逆のメチル化変動が多く、C>E回復445については予想に従ったメチル化変動(赤字)が多いことが明らかになった。

表1 仔肝臓の遺伝子発現変動と親精子ゲノムのメチル化変動との相関

仔肝臓遺伝子発現変動	遺伝子数 (プローブセット)	精子ゲノムメチル化変動 (TSS-500bp内)	遺伝子数 (プローブセット)
C<Eから C<ER を除いたもの	485	C<E	181
		C>E	12
		両方	11
C>Eから C>ER を除いたもの	445	C<E	133
		C>E	8
		両方	34

今後は仔肝臓のメチロームの解析を進め、雄親精子メチロームと比較することにより、仔の健康に影響するようなエピゲノム部位の探索を行ってゆく。

【参考文献】

- 1) Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, Tsuruoka N, Kiso Y, Sueyoshi T, Negishi M, Misaka T, Abe K. J Agric Food Chem. 2010 Feb 24;58(4):2168-73.
- 2) Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Rogi T, Tateishi N, Tsuruoka N, Kiso Y, Misaka T, Abe K. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(8):1635-7.
- 3) Nuclear receptor-mediated alleviation of alcoholic fatty liver by polyphenols contained in alcoholic beverages. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Ushiyama S, Kitagawa Y, Rogi T, Shibata H, Abe K, Misaka T. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e8714.

DNA マイクロアレイ装置の特性の探索

荒木 真由美、青木 信義、廣川 隆彦、瀬戸山 央（神奈川県産業技術センター）

1. はじめに

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は、近年そのスクリーニング手法としての有効性から普及が進んでいる。神奈川県産業技術センターでも、オカラ亜臨界水処理物^(1, 2)や杜仲葉熱水抽出物^(2, 3)の食品としての機能性を検討するため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析を行ってきた。

DNA マイクロアレイの測定装置としては、マイクロチップの製造方法や、検出の仕組みが異なる様々なプラットフォームが複数のメーカーより市販されており、それぞれのプラットフォームによって、使い勝手や測定結果に特徴があることが予想される。従って、研究の目的に応じて、プラットフォームを適切に選択することが重要だと考えられる。本研究では、同一のRNA サンプルを異なる2つのプラットフォームで測定した結果を比較し、プラットフォームによる測定結果の特徴を把握することによって、様々な研究課題に対して適切な条件での測定が実施出来るよう基礎的なデータを収集することを目的とした。

2. 実験と結果

2. 1 実験

2. 1. 1 測定データ

高コレステロール食給餌マウスへのオカラ亜臨界水投与実験⁽¹⁾で得られた2群（オカラ亜臨界水投与群、水道水投与群、n=3）のマウスの肝臓から抽出したRNAの発現変動を、A社又はB社製装置で測定した結果を使用した。

2. 1. 2 データ処理方法

各プラットフォームそれぞれの標準的な正規化手法を選択して正規化した。すなわち、A社での測定結果に対しては、robust multi-array average (RMA) 法、B社の装置の結果に対しては75%シフト法で正規化した。

得られた結果から、各実験群内で変動係数50%以内のプロープを選択し、さらに解析ソフトウェア GeneSpring でデータ処理し、T検定の結果、多重比較による補正 p 値 < 0.05 のプロープを選択した。

2. 2 結果

2. 2. 1 発現強度

測定された全遺伝子について、測定結果を図1に、発現強度に注目して整理した結果を図2に示した。図1は横軸、縦軸にそれぞれオカラ投与群と対照群の検出強度を示しており、横軸は左側、縦軸は下側が弱い発現強度を表して

いる。左下から右上にかけての直線上から外れたデータが各実験で発現の増加や減少が見られたプロープを表している。図1では、A社製装置に比べ、B社製装置で、左下に数多くのデータが観察された。

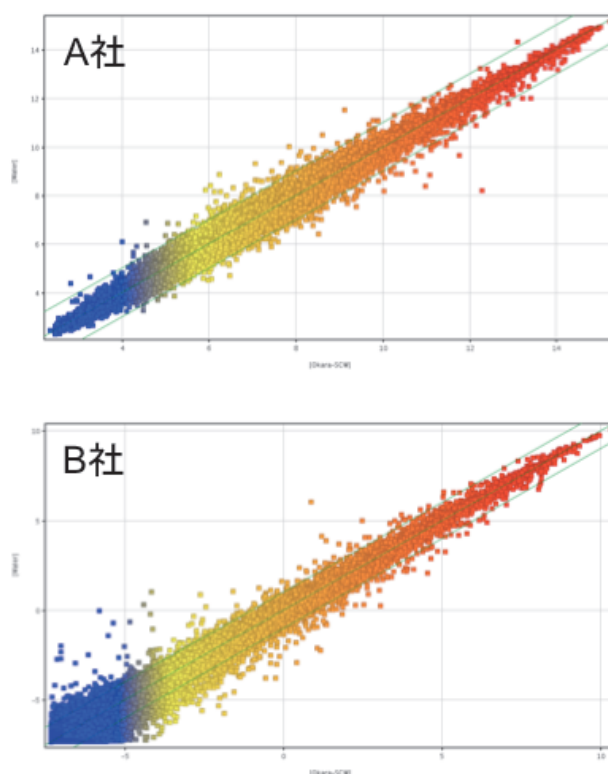


図1 A社（上）とB社（下）製の装置の測定結果（横軸と縦軸はそれぞれオカラ群、対照群の検出強度）

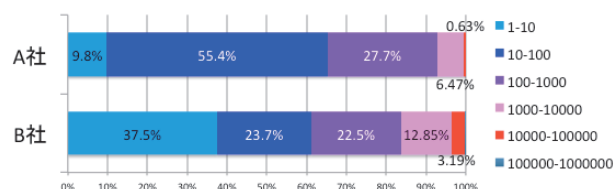


図2 A社（上）とB社（下）製の装置の測定結果の強度別分布

さらに、発現強度で整理した図2を見ると、A社の結果では、蛍光強度10~100のデータの割合が50%以上を占めているのに対し、B社の結果では、蛍光強度10以下の最も弱い発現強度のデータの割合が40%弱と高い割合をとな

っており、図1で観察された結果と一致した。

2. 2. 2 発現変動の検出

測定データを解析し、多重比較による補正p値 <0.05 のプローブを選抜した結果、B社製装置では3899個、A社製装置では1233個のプローブが選抜された。これらのプローブの共通性を検討したところ、202個が両装置で共通に選抜されていた(図3)。共通に選抜されたプローブは、A社製プラットフォームで得られた結果のうち16%、B社製プラットフォームで得られた結果のうち、5.3%を占めていた。



図3 遺伝子発現に変動があった遺伝子の共通性(青:A社、赤:B社)

図3で共通に選抜された遺伝子群、あるいはどちらかのプラットフォームのみで選抜された遺伝子群の特徴について検討するため、図3に示したこれらの共通性に注目して、発現強度で整理した結果を図4に示した。B社でのみ検出されたプローブで、蛍光強度10未満の割合は全体の35%を占め、全ての階級の中で最も出現率が高かった。さらに、低発現の蛍光強度100未満の割合はB社でのみ検出されたプローブ全体の65%を占めていた。

A社でのみ検出されたプローブで、蛍光強度10から100のデータの割合は、全体の29.7%と、全ての階級の中で最も出現率が高かった。蛍光強度が100未満の各階級でそれぞれ3割弱の割合を占めた

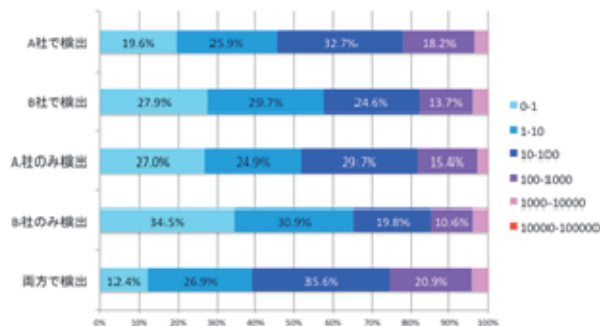


図4 プラットフォームによる発現強度の分布の違い

A社とB社、共通で検出されたプローブの中では、蛍光強度10から100の範囲で35.6%であるプローブが全ての階級の中で最も出現率が高かった。また、共通で検出されたプローブの蛍光強度の分布は、10から1000の範囲で全

体の62.5%を占めた。同じ強度範囲のプローブは、B社製プラットフォームでのみ検出された全プローブの50.7%、A社製プラットフォームでのみ検出されたプローブ全体の54.6%を占めていた。

3. 考察と今後の展望

図1及び図2で示したように、A社製プラットフォームに比べ、B社製プラットフォームで発現強度の低いデータを数多く観測されていた。さらに、選抜されたプローブの共通性に注目すると、共通に選抜されたプローブの割合は、A社製プラットフォームでは16%、B社製では、5.3%であり、予想よりも低い割合となった。

B社でのみ検出されたプローブの発現強度の分布を検討したところ(図3)、図1及び図2で示された「B社製プラットフォームでは、低発現の遺伝子が検出されやすい」という結果と一致した。それに対し、A社製プラットフォームでは、各階級の割合に大きな違いが無く、安定した分布であった。A社のプラットフォームは中程度の発現をカバーしていると言える。

共通に観測されたプローブについては、蛍光強度が10から1000のプローブが全体の62.5%を占め、A社のみ、あるいはB社のみで検出された場合と比較して、共通で検出されたプローブでは、比較的この範囲のプローブの割合が高く、すなわち、両プラットフォームが共通して良く検出するのは、中程度の発現遺伝子が多かった。

以上の結果から、A社製は中程度の発現の遺伝子を検出しやすいこと、B社製は低発現の遺伝子の検出率が高いこと、共通して検出された遺伝子は、発現が中程度の遺伝子が多いことが分かった。また、今回は、プラットフォーム間で共通する遺伝子の割合が小さく、プラットフォームの選択が重要であることを示唆する結果となった。ただし、本研究は極めて限定された条件での比較であり、さらに多くのデータの比較検討を行って信頼性を高める必要がある。

【参考文献】

1. 大澤利幸、廣井哲也、廣川隆彦、荒木真由美、平成20年度研究概要(神奈川科学技術アカデミー)、176-178(2009).
2. 荒木真由美、廣川隆彦、廣井哲也、青木信義、瀬戸山央、大澤利幸、平成21年度研究概要(神奈川科学技術アカデミー)、203-205(2010).
3. Y. Kobayashi, T. Hiroi, M. Araki, T. Hirokawa, M. Miyazawa, N. Aoki, T. Kojima, T. Ohsawa, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92** (2), 358-365 (2012).
4. 荒木真由美、青木信義、廣川隆彦、瀬戸山央、平成24年度研究概要(神奈川科学技術アカデミー)、46-49 (2013).

発がんプロモーション関連遺伝子の探索

大森 清美 (神奈川県衛生研究所)

1. はじめに

食品添加物および医薬品等、化学物質の発がん性を予測するための試験法として、Ames 試験、小核試験および染色体異常試験 (またはマウスリンフォーマ試験) のいわゆる「変異原試験 3 点セット」を実施することが法的に義務づけられている。しかし、これらの試験法では検出できない発がん物質が少なからず存在することが近年問題となっており、そのような非変異がん原性物質の多くは、発がんプロモーターであることも予測されている。化学物質による発がんリスクを低減させるためには、多段階発がんの機構における発がんプロモーターによる暴露を避け、腫瘍形成を回避することが重要となる。しかしながら、公的に認定された高感度かつ汎用性の高い発がんプロモーション試験法が存在しなかったことから、ほとんどの化合物について、発がんプロモーション活性の評価は行われてこなかった。そこで、大森らは重点基礎研究において、発がんプロモーター検出のための細胞形質転換試験法である Bhas42 細胞形質転換試験法を開発した¹⁾。Bhas42 細胞形質転換試験法は、多くの発がんプロモーターを高感度に検出することが可能であり¹⁾、食品に係わる化学物質^{2,3)}をはじめ様々な試料⁴⁻⁸⁾の発がんプロモーション活性の検出が可能である。また、試験結果の室間再現性も良好であることから⁷⁾、経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) の国際標準試験法としての認定に向けて、EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) で Bhas42 細胞形質転換試験法の評価が行われており、2013 年 11 月には「EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line」が公表された⁹⁾。Bhas42 細胞形質転換試験では、腫瘍細胞で認められる形質を特徴とした形質転換フォーカスの形成をエンドポイントとしているため、確度の高い試験法であると考えられる。しかし、形質転換フォーカスの形成メカニズムについては、報告がほとんど無いことから、Bhas42 細胞形質転換試験法の有用性を提示するためには、メカニズムに関する研究データが不可欠であると考えられる。

そこで、既知発がんプロモーター (P-1) による経時的な遺伝子発現変動について DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。

2. 実験と結果

2. 1 既知発がんプロモーター (P-1) 処理による経時的な細胞形態の変化

2. 1. 1 細胞試料の調製および細胞観察

新たに保存細胞株を解凍し、5%牛胎児血清 (FBS) を添加した DMEM/F12 培地 (DF5F) で前培養を行った。同培地を用いて Bhas42 細胞の 7×10^3 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、6well プレートに 2mL/well ずつ播種した。細胞播種 4 日後に、既知発がんプロモーター (P-1) の DMSO 溶液を添加した DF5F で、溶媒対照群は、DMSO 溶液 (0.1%) を添加した DF5F で培地交換を行った。P-1 および DMSO 処理から 1 時間後、6 時間後、24 時間後および 8 日後 (播種 12 日後) に細胞観察と RNA 抽出用細胞試料液を調製し、 -80°C で保存した。なお、保存凍結細胞の解凍から RNA 抽出用細胞試料液の調製までは、完全繰り返し実験 3 回を実施し、各回の試料液を $n=1$ として 1 群 $n=3$ とした。

P-1 処理後の経時的な細胞観察の結果、DMSO 0.1% (溶媒対照) 群に対して、P-1 処理 1 時間および 6 時間後の Bhas42 細胞は、細胞密度には変化はないが、プレートへの接着状態と顕著な形態変化が認められた。24 時間後および 8 日後は、溶媒対照群に対して、細胞密度および形態の変化と細胞の重なり合いが、さらに 8 日後の細胞には、初期の形質転換フォーカス形成が認められた。

2. 2 既知発がんプロモーター (P-1) 処理による経時的な遺伝子発現変動

2. 2. 1 RNA 試料の抽出精製

凍結保存した細胞試料液を解凍し、クロロホルム分配およびイソプロパノール沈殿によりトータル RNA を抽出し、RNeasy Mini (QIAGEN 社) により精製を行った。得られたトータル RNA 試料について、RNA 濃度および Agilent 2100 バイオアナライザによりクオリティー評価を行った。その結果、RNA Integrity Number (RIN) 値は、いずれも 9.0 以上であり、高いクオリティーのトータル RNA 試料が得られていることが確認された。

2. 2. 2 DNA マイクロアレイ分析用 RNA 試料の調製および分析 RNA 試料の抽出精製

精製後のトータル RNA について、3' IVT Express Kit (アフィメトリクス(株)) を用いて、cDNA に逆転写後、ラベル化 aRNA を調製し、精製した後、フラグメンテーションを行った。GeneChip Hybridization, Wash, and stain Kit (アフィメトリクス(株)) の試薬と混合し、Mouse Genome 430 2.0 アレイ (アフィメトリクス(株)) に注入後、 45°C で 16 時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの終了後、アレイの中の溶液を除去し、同キットを用いて Fluidics Station 450 (アフィ

メトリクス(株))で洗浄および染色後、Scanner 3000 7Gにて画像データを取得し、DNA マイクロアレイ分析を行った。

2. 2. 3 群間比較による発現変動遺伝子の解析

qFARMSにより正規化したCELデータについて、Rank ProductsによりDMSO 0.1%処理群に対して各披験化学物質処理群で有意(FDR < 0.05)にmRNAの発現が増大したプローブセットおよび減少したプローブセットを抽出し、Ingenuity Pathway Analysis(IPA)を用いて解析を行った。各処理時間群のDiseases & Bio Function解析において、Diseases or Functions AnnotationをActivation z-scoreが2以上を活性化された因子、-2以下を抑制された因子としてそれぞれ上位10因子を抽出した結果、P-1処理後1

時間では、活性化された因子は生物体の死のみであり、抑制された因子は細胞の運動および遊走、細胞骨格の組織化などであった(図1)。P-1処理後6時間では、細胞の運動および遊走、RNAの転写活性化などが活性化され、炎症、過形成、細胞周期のS期への進入、がんおよび腫瘍化などが抑制された(図2)。しかし、P-1処理後24時間には、細胞増殖、S期、がんおよび悪性新生物、タンパク合成、DNA修復などが活性化され、胚の死、DNAおよびRNAの転写、細胞の分化などが抑制された(図3)。さらに、P-1処理後8日には、生物体の死、細胞増殖、運動障害、成長阻害、形成不全などが活性化され、細胞骨格の組織化、細胞性突起の形成および成長、腫瘍細胞株の細胞運動などが抑制された(図4)。

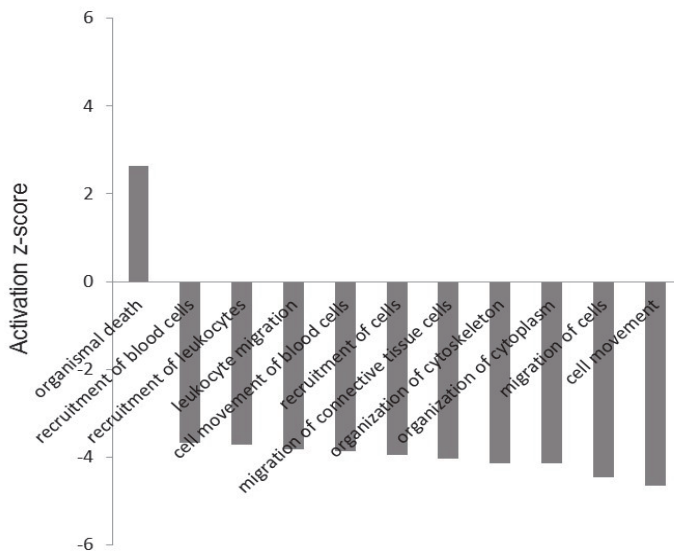


図1 P-1処理後1時間のDiseases or Functions Annotation

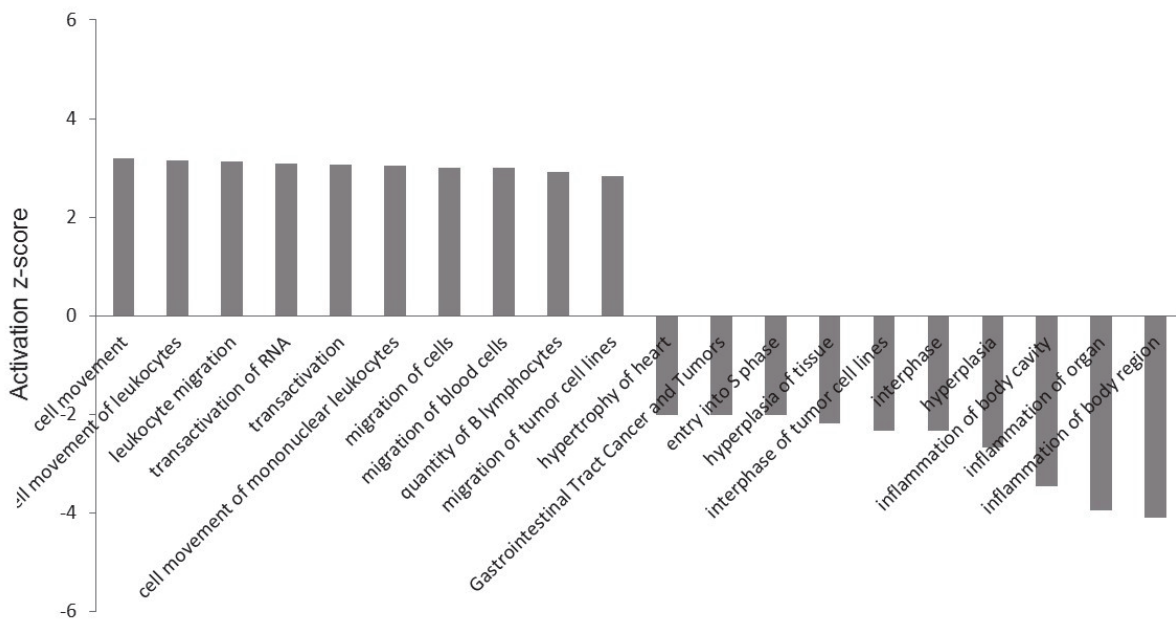


図2 P-1処理後6時間のDiseases or Functions Annotation

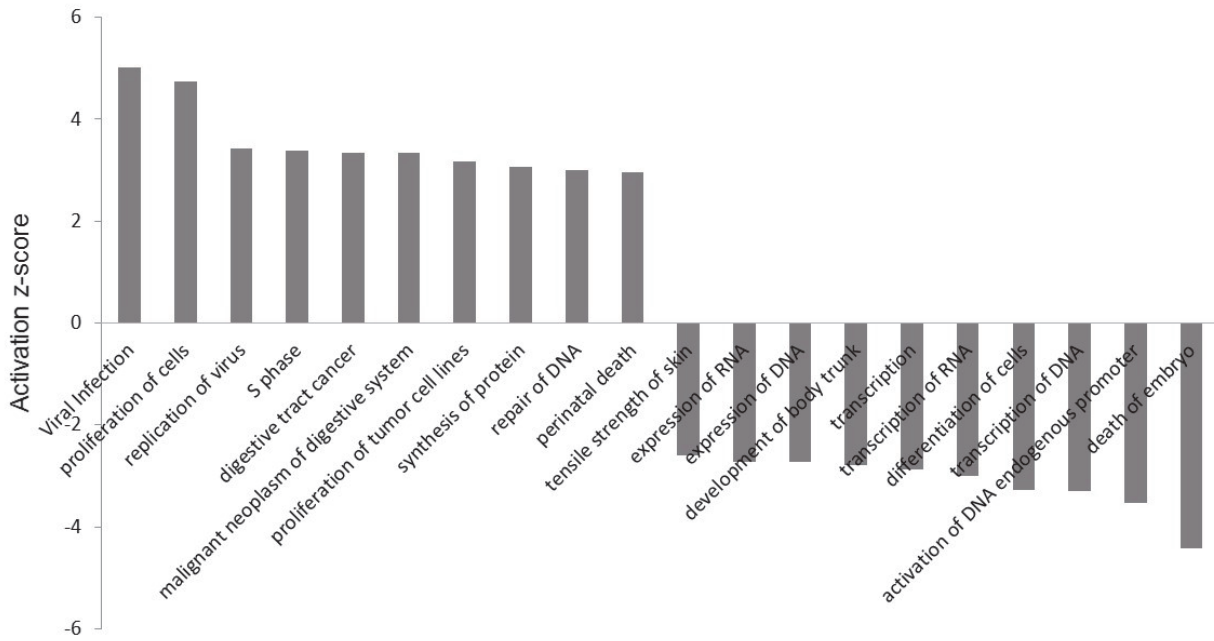


図3 P-1 処理後 24 時間の Diseases or Functions Annotation

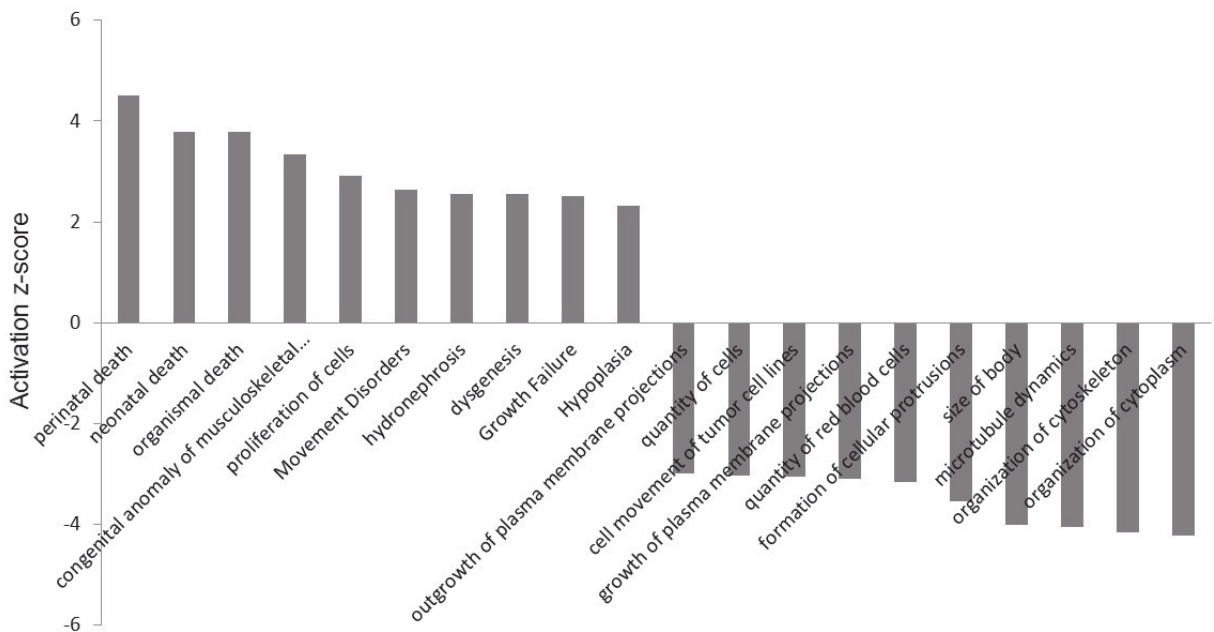


図4 P-1 処理後 8 日の Diseases or Functions Annotation

3. 今後の展望

発がんプロモーション関連遺伝子の探索として、P-1 以外の既知および新規発がんプロモーターについて、マイクロアレイを用いてゲノミクス解析(トランスクリプトーム解析)を実施しており、発がんプロモーションの関連遺伝子のデータが多数蓄積されることにより、発がんプロモーションのメカニズム解明に繋がるものと考え。また、発がんプロモーション抑制遺伝子の探索では、種々の物質の発がんプロモーション抑制効果および抑制補助効果を検討し、それらの物質によるマイクロアレイによる遺伝子

発現変動を解析することにより、発がんプロモーション抑制のマーカー遺伝子の特定に繋がるものと考え。

【参考文献】

1. Ohmori, K., Sasaki, K., Asada, S., Tanaka, N., and Umeda, M., An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutation. Research*, 557, 191 (2004)
2. Sakai, A., Suzuki, C., Masui, Y., Kuramashi, A., Takatori, K., Tanaka, N., The activities of mycotoxins

derived from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutation. Research*, 630, 103 (2007)

3. Ohmori K, Kawamura Y., Cell transformation activities of abietic acid and dehydroabietic acid: safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use, *Food Addit Contam*, 26, 568 (2009)

4. Ezoe, Y., Ohkubo, T., Ohmori, K., Fushiwaki, Y., Mori, Y., Umeda, M. and Goto, S., Promoter and mutagenic activity of particulate matter collected from urban air, *Journal of Health Science*, 50, 181 (2004)

5. 大森清美, 中島大介, 江副優香, 森康明, 伏脇裕一, 遠藤治, 武田健, 後藤純雄, 粒径別に分級採取した空気浮遊粒子の発がんプロモーション活性, *環境化学*, 16, 119-123 (2006)

6. Ohmori, K., Sato, Y., Nakajima, N., Kageyama, S., Shiraishi, F., Fujimaki, T., Goto, S., Characteristics of the transformation frequency at the tumor promotion stage of airborne particulate and gaseous matter at ten sites in Japan, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 15, 1031 (2013).

7. Ohmori, K., Umeda, M., Tanaka, N., Takagi, H., Yoshimura, I., Sasaki, K., Asada, S., Sakai, A., Asakura, M., Baba, H., Fushiwaki, Y., Hamada, S., Kitou, N., Nakamura, T., Nakamura, Y., Oishi, H., Sasaki, S., Shimada, S., Tsuchiya, T., Uno, Y., Washizuka, M., Yajima, S., Yamamoto, Y., Yamamura, E., and Yatsushiro, T., An inter-laboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33, 619 (2005).

8. Ohmori K., Sato Y., Nakajima D., Kageyama S., Shiraishi F., Fujimaki T., Goto S., Characteristics of the transformation frequency at the tumor promotion stage of airborne particulate and gaseous matter at ten sites in Japan, *Environ Sci Process Impact*, 1:15(5), 1031 (2013).

9. EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing,
EURL ECVAM RECOMMENDATION on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line, November (2013).

生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発

廣岡 孝志、大森 清美

1. はじめに

我が国の癌（悪性新生物）による死亡率は非常に高く、平成 24 年度の人口動態統計においても死因別死亡率の第一位となっている (1)。従って、発がん性の予測は、医薬品、農薬や食品添加物など化学物質の安全性評価において最も重要な項目である。化学物質の発がん性を予測する試験として、ラットやマウスを用いた *in vivo* 試験（長期発がん性試験）および培養細胞や微生物などを使用した *in vitro* 試験（遺伝毒性／変異原性試験）が設定されている。

1.1 細胞形質転換試験

生体内の正常細胞は、いくつかの段階を経てがん細胞へと転換する。この正常細胞のがん細胞への転換、そして悪性腫瘍の形成までのプロセスは多段階発癌（multistep carcinogenesis）と呼ばれる (2, 3)。すなわち図 1 に示すように正常細胞が遺伝毒性（変異原性）を有する化学物質により DNA の損傷（突然変異）を受けることにより前がん細胞へと変化する。このプロセスは“開始（イニシエーション）”と呼ばれ不可逆的に進行する。このイニシエーションを引き起こす遺伝毒性化学物質はイニシエーターと呼ばれる。この段階の前がん細胞は異常増殖を示さないが、次の“促進（プロモーション）”と呼ばれる段階で化学物質の刺激を受けることにより増殖制御システムの破綻が誘発され異常な細胞増殖を起こし、前がん細胞からがん細胞へと転換され、腫瘍が形成される。このプロモーションを引き起こす化学物質は、プロモーターと呼ばれ、非遺伝毒性化学物質においてプロモーションを引き起こすものが存在することが明らかになりつつある。さらに、異常な細胞増殖にともなう変異細胞の蓄積により腫瘍は悪性化する。この段階は“進行（プログレッション）”と呼ばれる。

化学物質の発がん性を予測する *in vitro* 試験法として、細菌を用いた Ames 試験（復帰突然変異試験）や DNA 損傷・修復試験、哺乳類培養細胞を用いた染色異常試験などでは、化学物質の遺伝毒性、つまりイニシエーション活性の有無を予測することができる。一方、多段階発癌プロセスで示されたように、遺伝毒性を有さない化学物質においてもプロモーション作用により腫瘍形成に関与するものが存在する。従って、これらの非変異発がん物質が持つプロモーション活性も予測する必要がある。しかしながら、先に示した遺伝毒性アッセイでは、非変異発がん物質のプロモーション活性の予測を行うことはできない。

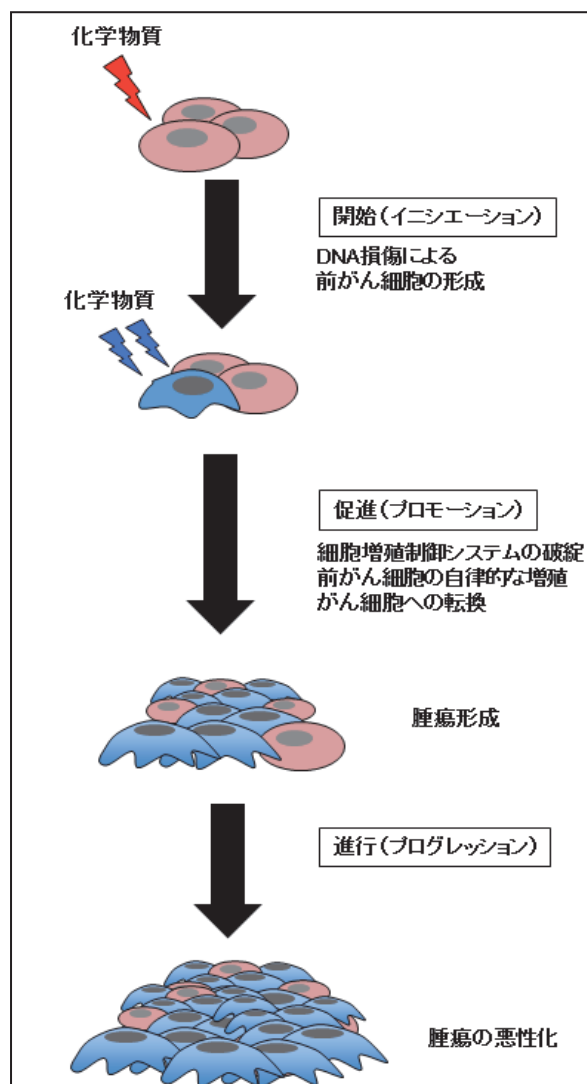


図 1. 多段階発癌プロセス

細胞形質転換試験は、動物細胞を用いて化学物質の発がん性を予測する *in vitro* 試験法の 1 つである。細胞形質転換試験ではこれまでに、Syrian hamster embryo cell (SHE), BALB/c3T3, C3H10T1/2 などの細胞が利用されてきた。SHE 細胞を用いたアッセイでは、細胞形態転換を、BALB/c3T3, C3H10T1/2 を用いたアッセイでは腫瘍形成能の獲得に伴うフォーカス形成を指標として被験物質の発がん性予測を行う。細胞形質転換試験のうちフォーカス形成過程は、多段階発癌プロセスの開始と促進のステップを再現していることから非変異発がん物質のプロモーション活性の予測が可能である (4)。近年になり BALB/c3T3

にがん遺伝子 v-Ha-ras が組み込まれた Bhas42 が作成され、大森らにより、この Bhas42 を利用した形質転換試験法が開発された (5)。さらに、浅田らは、プロトコールの変更により Bhas42 細胞形質転換試験でイニシエーション活性を予測できることを示した (6)。

1.2 肝代謝を組込んだ細胞形質転換試験法の開発

化学物質には、生体内で代謝されることにより毒性を獲得するものも存在する。発がん性を示す化学物質においても生体内で代謝を受けることによりイニシエーションもしくはプロモーション活性を示すものが存在する事が知られている。例えば、Benzopyren, nitrosamine などの化学物質は、シトクロム P-450 による代謝を受けることにより発がん性を示すことが知られている (7, 8)。このような発がん性化学物質の代謝活性化を、単一細胞培養による細胞形質転換試験法により評価することは難しい。

哺乳類細胞を用いて生体内代謝による化学物質の発がん性を予測する試験方法については BALB/c3T3 細胞および V79 細胞で報告例がある。BALB/c3T3 細胞では、S9mix を代謝反応系としたプロセスにより Cyclophosphamide, dimethylnitrosamine, 2-aminofluorene, 2-naphtylamine の発がん性について試験を行った結果、S9mix による前処理によりすべての被験物質が BALB/c3T3 細胞に形質転換を誘発し、非処理群では形質転換は誘発しなかったことを確認している (9,10)。また、V79 細胞では肝臓ミクロソームや肝細胞を加えた培養系を用いて nitrosamine 類のイニシエーション活性を評価している (7, 11)。Bhas42 細胞を用いた細胞形質転換試験については、生体内代謝による発がん性物質の活性化を考慮した試験方法についてはまだ検討されていない。

本研究の目的は、Bhas42 細胞形質転換試験法について代謝活性化により獲得もしくは増強された化学物質の発がん性の予測に対応した試験方法を開発する事である。H26 年度は、H25 年度と同様に Bhas42 細胞形質転換試験系に肝代謝系として加えるヒト肝細胞株の探索とその薬物代謝酵素チトクロム P-450 (CYP) の発現とその活性について検討した。

2. 実験と結果

2.1 Bhas42 細胞形質転換試験に導入可能な代謝系としての肝細胞の探索

使用可能な肝細胞としては、初代ヒト肝細胞、ヒト肝がん細胞 (Cell line) およびヒト iPS 誘導肝細胞が候補として挙げられる。各細胞の長所と短所を表 1 に示す。導入に使用する細胞の条件として、①増殖能力を有し、凍結保存による長期利用が可能、②肝代謝能力を有し、ロット間による差が少ない、③入手が比較的容易などが挙げられる。また、これらの条件に加えて④Bhas42 細胞形質転換試験培地である 5%血清 (FBS) 含有 DMEM/F12 培地 (DF5F) 中で増殖でき十分な肝代謝機能を発揮できるこ

とが必要である。本年度も研究に頻用されているヒト肝がん細胞 HepG2 について、DF5F 培地による培養条件下での薬物代謝酵素の発現とその活性について検討を行った。

表 1. 各種培養肝細胞の比較

	初代ヒト肝細胞	ヒト肝がん細胞	ヒトIPS細胞誘導肝細胞
細胞増殖能	なし	高い増殖能を持つ	未分化細胞で増殖能あり
凍結保存	基本使い切り	凍結細胞による保存可	未分化細胞で保存可能
肝代謝機能	高い	低い(例外あり)	高いと予測される
代謝機能のロット間差	大きい	小さい	小さいと予測
細胞入手と維持コスト	高い	低い(例外あり)	高い
取り扱い	難しい	容易	難しい
評価試験への利用性	難しい	細胞によっては高い	現時点では難しい

2.2 ヒト肝がん細胞 HepG2 における薬物代謝酵素チトクロム P-450(CYP)の発現と CYP1A1/2 および CYP3A4 の活性

5%血清 (FBS) 含有 DMEM/F12 培地 (DF5F) で培養した HepG2 より回収した細胞タンパク質について、Western blot 解析により CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6 および CYP2C9 タンパク質の発現レベルを調べた。その結果、CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 のタンパク質発現が HepG2 で確認された。

しかし、発がん性物質の代謝活性化に重要な CYP1A1/2 と CYP3A4 の活性を測定した結果、DF5F 培養した HepG2 において両 CYP 活性は検出されなかった。

2.3 CYP 強制発現ヒト肝がん細胞 HepG2 における検討。

HepG2 は DF5F 培地を用いた培養条件下で良好な細胞増殖と細胞維持を示したが、CYP の酵素活性は確認できなかった。一方、ヒト肝がん細胞株を利用した薬物代謝研究において肝代謝機能に関与する酵素を強制的に発現させた細胞の利用が注目されている(12)。そこで、次に CYP 強制発現 HepG2 細胞について、DF5F 培養条件下における CYP 活性について検討した。その結果、CYP3A4 の細胞内におけるタンパク質発現とその酵素活性を検出することができた (図 2)。

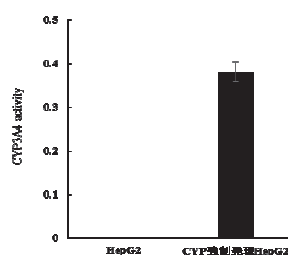


図 2. DF5F 培地培養条件下における HepG2 と CYP 強制発現 HepG2 の CYP3A4 活性

3 . 考察及び今後の展望

ヒト肝がん細胞 HepG2 について, DF5F 培地を用いた培養条件下における薬物代謝酵素 CYP1A1, 1A2, 3A4, 2B6 および 2C9 の細胞内発現およびその活性についての検討を行った。その結果, HepG2 細胞内における薬物代謝酵素の発現は確認できたが, その活性は非常に低いものであった。一方, CYP 強制発現 HepG2 細胞について同様の検討を行った結果, DF5F 培地を用いた培養条件下で高い CYP3A4 活性を確認することができた。

今後の展望として, ①その他の肝がん細胞株の利用についても引き続き検討するとともに, ②CYP 強制発現 HepG2 の Bhas42 細胞形質転換試験法への導入, および③代謝によりイニシエーションおよびプロモーション活性を示す化学物質について試験を行っていく予定である。

【参考文献】

1. 平成 24 年度 人口動態統計月報年計 (概数) の概況, 厚生労働省(2014).
2. 山崎聖典, 岡山大学医学部保健学紀要, 14,1-14 (2003).
3. Harris CC, Weston A, Willey JC, Trivers GE, Mann DL, Environ. Health Perspect., 75, 109-119 (1987).
4. Creton S, Aardema MJ, Carmichael PL, et. al., Mutagenesis, 27, 93-101(2012).
5. Ohmori K., Sasaki K., Asada S., et al., Mutat. Res., 557, 191-202 (2004)
6. Asada S, Sasaki K, Tanaka N, et. al., Mutat. Res., 588, 7-21(2005).
7. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y., Cancer Sci., 95, 1-6(2004).
8. Kuroki T, Drevon C, Montesano R., Cancer Res., 37, 1044-1050 (1977).
9. McCarvill JT, Lubet RA, Schechtman LM, Kouri RE, Putman DL, Environ. Mol. Mutagen., 16, 304-310 (1990).
10. Sheu CJ, Lee JK, Rodriguez I, Randolph SC, Drug Chem. Toxicol., 14,113-126 (1991).
11. Langenbach R, Freed HJ, Huberman E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2864-2867 (1978).
12. Hashizume T., Yoshitomi S., Asahi S., et.al., Toxicol Sci., 116, 488-497 (2010).

DNA マイクロアレイ解析を活用した湘南ゴールドの機能性評価

湘南ゴールドの摂取がラット肝臓脂質代謝へ与える影響

久保 深雪・吉田 誠（神奈川県農業技術センター）、小林 征洋（東京海洋大学）

1. はじめに

‘湘南ゴールド’は神奈川県農業技術センターで育成した柑橘である。1988年に‘今村温州’を‘黄金柑’に交配して得られた実生の中から選抜・育成した品種で、樹や果実の特性から‘黄金柑’の珠心胚実生と考えられている。果形は球形で、‘黄金柑’よりやや大きく、果皮は黄色で、薄く、果面が滑らかで剥皮しやすい。果肉も黄色く、柔軟多汁で、風味がよい。収穫期は3月で、神奈川県の新しい柑橘として注目を集めている¹⁾。現在、‘湘南ゴールド’について、栽培、品質特性²⁾、品質保持³⁾、非破壊品質評価⁴⁾などの研究を行い、その生産振興を図っている。その一環として‘湘南ゴールド’の機能性評価研究により、フラボノイド類のナリルチン、ヘスペリジンが主要な機能性成分であることを見いだした。その特徴は、他の柑橘と比較し、果皮、果肉ともナリルチンが多く含まれること、果皮ヘスペリジンは、‘清見’、普通温州ミカンである‘青島’よりも多く、‘宮川早生’と同程度であること、部位別フラボノイド含有量は、ナリルチン、ヘスペリジンともに、アルベド（内果皮）>じょうのう膜>フラベド（外果皮）>砂じょう（果肉）の順であること、未熟果と成熟果では、未熟果でフラボノイド類が若干多い傾向にあることなどを明らかにした。フラボノイド類には、抗酸化作用や血清脂質低下作用、抗アレルギー作用等が報告されている⁵⁾。また、欧米の疫学調査から、これらのフラボノイドの摂取量が多いグループでは、がんや心筋梗塞等による死亡率が低下することなどが報告されている⁶⁾。

そこで、これらフラボノイドの機能性を期待し、‘湘南ゴールド’を投与した高脂肪食負荷マウスについて解析を行うとともに、肝臓についてDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、アラキドン酸代謝を含む脂質代謝やアミノ酸代謝に関連する遺伝子、アポトーシス誘導やDNA 損傷シグナル伝達に関連する遺伝子、薬物代謝に関する遺伝子の発現が変動していることが明らかとなった。脂質代謝については、促進する方向に遺伝子が動いていることが確認された。また、アラキドン酸カスケードに変化が認められ、体温や免疫などの調整を行う生理活性物質であるエイコノサイドに関連する酵素遺伝子の発現が変動していることが確認された。

以上を基に、平成26年度は肝臓の脂質代謝への影響を検討した。

2. 実験と結果

2. 1 実験方法

既報で報告したとおり、6週齢の雄性 Crlj:Wistar ラットを普通食 (CE-2) で1日、低脂肪食で1週間予備飼育した後、低脂肪食 (Low Fat Diet: LFD)、高脂肪食 (High Fat Diet: HFD)、HFD+湘南ゴールド (SG) 果皮凍結乾燥粉末 3% 混合食 (SG3%HFD) の3群に分け54日間飼育した。給餌は、ペアフィーディングを行い、SG3%HFD 群の平均摂取量から、翌日、HFD、LFD 群に同じカロリー量の餌を与えた。飼育終了後、肝臓を摘出し供試した。

脂質代謝関連酵素として、リポ蛋白リパーゼ (LPL) 及び脂肪酸水酸化酵素である CYP4A1 を測定調査した。ラット肝臓の尾状突起から粗酵素液を抽出し、CYP4A1/A2/A3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または LPL 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ELISA POD 基質 TMB キット Popular (ナカライテスク) を使用して発色し、450 nm 吸光度を測定し、酵素活性とした。

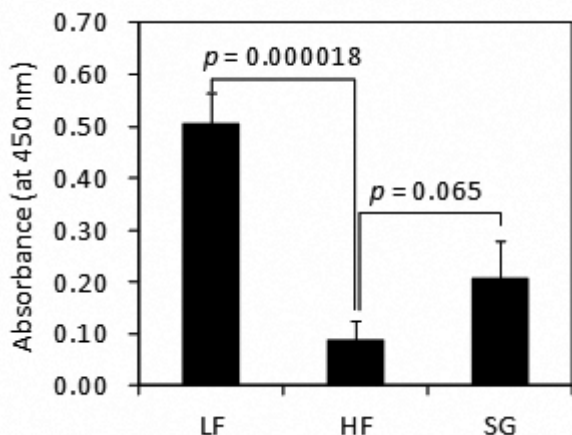
肝臓中脂質として、遊離脂肪酸、コレステロール、トリグリセリドラットを測定した。肝臓尾状突起から、Bligh-Dyer 法の変法で脂質抽出を行い、ラボアッセイ™ トリグリセライド [GPO・DAOS 法] (和光純薬)、ラボアッセイ™ コレステロール [コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法] (和光純薬) 及びラボアッセイ™ NEFA [ACS・ACOD 法] (和光純薬) を使用して測定した。

2. 2 実験結果

ラット肝臓における CYP4A1/A2/A3 の発現は、低脂肪食と高脂肪食では同等であったが、‘湘南ゴールド’を摂取すると、発現が増加した (データ略)。LPL の発現は、高脂肪食で抑制されたが、‘湘南ゴールド’を摂取すると増加する傾向があった (図1)。

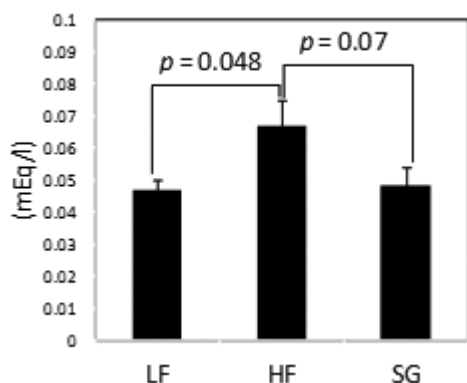
ラット肝臓中の遊離脂肪酸量は、高脂肪食で増加し、‘湘南ゴールド’を摂取するとその上昇を抑制した (図2)。コレステロール量は、高脂肪食で増加し、‘湘南ゴールド’を摂取すると上昇を抑制する傾向があった (データ略)。トリグリセリド量は、高脂肪食で増加し、湘南ゴールドを摂取することで上昇を抑制する傾向があった (データ略)。

以上のとおり、‘湘南ゴールド’を摂取すると、脂質代謝を促進する CYP4A1/A2/A3 及び LPL の発現が増加する傾向にあった。また、高脂肪食摂取による肝臓中遊離脂肪酸量、コレステロール量及びトリグリセリド量の上昇が抑制傾向にあった。



LF: 低脂肪食群 (n=11)、HF: 高脂肪食群 (n=12)、SG: 高脂肪食+湘南ゴールド群 (n=12)

図1 湘南ゴールドの摂取によるラット肝臓における脂質代謝関連酵素 (LPL) の発現



LF: 低脂肪食群 (n=11)、HF: 高脂肪食群 (n=12)、SG: 高脂肪食+湘南ゴールド群 (n=12)

図2 湘南ゴールド摂取によるラット肝臓遊離脂肪酸への影響

3. 考察及び今後の展望

昨年度までの DNA マイクロアレイの結果による解析で、脂質代謝関連遺伝子の発現変動について、脂肪酸β酸化やω酸化に関連する酵素遺伝子の発現が上昇し、脂肪酸合成酵素を活性化する転写因子である *Srebf1* の発現は低下していた。このため SG3%HFD 群では脂質代謝を促進する方向に遺伝子が動いていることが確認された。

本年度、この結果を確認するために、ラット肝臓中の脂質代謝関連酵素の活性、脂質等の含有量を分析調査した。その結果、脂質代謝を促進する CYP4A1/A2/A3 及び LPL の発現が増加、脂質関連物質の高脂肪食による上昇抑制が見られた。

以上のように、遺伝子発現解析の結果と実際の酵素、物

質変動が一致したことから、‘湘南ゴールド’果皮の摂取が脂質代謝を促進することが確認された。これらは、‘湘南ゴールド’に含まれるフラボノイド類に起因することが考えられる。

今後、さらに遺伝子発現の変動と実際の物質変動の解析を行い‘湘南ゴールド’の機能性を明らかにしたい。

本実験を進める上で、KAST、神奈川衛研の関係各位に多大なるご助力をいただいた。謝意を表す。

【参考文献】

- 1) 真子正史, 鈴木真一, 鈴木誠, 他. 神奈川農総報 145, 35-41 (2004)
- 2) 曾我綾香, 吉田誠, 浅田真一. 園学研 7 別 2, 633 (2008)
- 3) 曾我綾香. 平成 20 年度助成による研究成果要約, (財) 園芸振興松島財団, 10-13 (2011)
- 4) Yoshida M, Soga A, Kawano A. Proceeding of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy, 281-284 (2010)
- 5) Middleton E Jr, et al., Pharmacol. Rev., 52, 673-751 (2000)
- 6) 杉浦 実. “第 9 節 柑橘フラボノイドと高コレステロール血症”. 食品機能性の科学, 食品機能性の科学編集委員会, フジ・テクノシステム pp. 185-188 (2008)
- 7) Ghorbani A, Nazari M, Jeddi-Tehrani M, Zand H. Eur. J. Nutr. 51, 39-46 (2012)

業 績

【原著論文】

1. Horiba, T., Katsukawa, M., Abe, K., and Nakai, Y.
Alpha-mangostin promotes myoblast differentiation by modulating the gene-expression profile in C2C12 cells.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 78(11):1923-9 (2014)
2. Kikuchi, Y., Toyoda, T., Ishijima, T., Abe, K., Nakai, Y., and Fukudome, S.
Oral administration of the AYA strain of *Lactobacillus plantarum* modulates expression of immunity-related genes in the murine Peyer's patch: a DNA microarray analysis
Biosci. Biotechnol. Biochem. 78(11):1935-8 (2014)
3. Midorikawa, K., Kuroda, M., Terauchi, K., Hoshi, M., Ikenaga, S., Ishimaru, Y., Abe, K., and Asakura, T.
Additional nitrogen fertilization at heading time of rice down-regulates cellulose synthesis in seed endosperm.
PLoS ONE e98738 (2014)
4. Nekohashi, M., Ogawa, M., Ogihara, T., Nakazawa, K., Kato, H., Misaka, T., Abe, K., and Kobayashi, S.
Luteolin and Quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-Pick C1 Like 1 in Caco-2 cells and rats.
PLoS ONE 9(5):e97901 (2014).
5. Miyazaki, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Kondo, T., Takahashi, S., and Inoue, S.
EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes
Oncogenesis 3:e126. doi: 10.1038/oncsis.2014.40. (2014)
6. Tamura, T., Kamei, A., Ueda, R., Arai, S., and Mura, K.
Characterization of the quality of imbibed soybean at an early stage of pre-germination for the development of a new protein food item.
Biosci Biotechnol Biochem. 78(1):115-23 (2014)
7. Kobayashi, S., Kato, T., Azuma, T., Kikuzaki, H., Abe, K.
Anti-allergenic Activity of Polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*,
Journal of Functional Foods 13:100-107 (2015)
8. Kurokawa, A., Narukawa, M., Ohmoto, M., Yoshimoto, J., Abe, K., and Misaka, T.
Expression of the synaptic exocytosis-regulating molecule complexin 2 in taste buds and its participation in peripheral taste transduction.
J. Neurochem. 133(6):806-814 (2015)

9. Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Kondo, T., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S., and Abe, K.
Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet : a transcriptome analysis.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 2015 May 18:1-5. (2015)

【総説】

1. 安岡顕人、荒井綜一、阿部啓子
食の三次機能とニュートリゲノミクス、*Pharma Medica* 32(8):15-20(2014)
2. 亀井飛鳥
オミクス解析からみるタンパク質・アミノ酸栄養効果と皮膚機能、*アミノ酸研究* 8(2):117-125 (2014)

【口頭発表】

1. 安岡顕人
ニュートリゲノミクス各論—飲酒と肥満児—食品ポリフェノールとエピゲノム
日本食糧新聞社食品ニューテクノロジー研究会 2014年4月例会 (2014年4月 東京)
2. 安岡顕人、姚 瑞卿、亀井飛鳥、牛尼翔太、阿部啓子、三坂 巧
食品ポリフェノールによる核内受容体を介したアルコール性脂肪肝の抑制
BIO tech 2014 (2014年5月 東京)
3. 亀井飛鳥
DNA マイクロアレイを用いた食品の機能性評価
バイオチップコンソーシアム (JMAC) ワーキンググループ会議 (2014年5月 東京)
4. 近藤 隆、近藤 香、古関明彦
Polycomb mediates transcriptional activation of *Meis2* through promoter-enhancer interaction
2014年度日本発生生物学会 (2014年5月 愛知)
5. 亀井飛鳥、渡部由貴、篠崎文夏、荒井綜一、阿部啓子
メープルシロップ抽出物が高脂肪食摂取マウスの肝臓に及ぼす影響
第68回日本栄養・食糧学会大会 (2014年6月 北海道)
6. 阿部啓子
食品の新しい機能性評価法開発の将来展望
NPO 法人 21世紀の食と健康文化会議シンポジウム (2014年6月 東京)
7. 阿部啓子
カナダ産メープルシロップの機能性：メタボリックシ

ンドロームに対する効果について

第 61 回日本栄養改善学会学術総会、ランチョンセミナー (2014 年 8 月 神奈川)

8. 阿部啓子

機能性食品研究の過去・現在を眺め、その未来像を考える

東京工科大学食品セミナー (2014 年 9 月 東京)

9. 阿部啓子

Analysis of physiological function of maple syrup by nutrigenomics

247th ACS National Meeting & Exposition メープル研究成果発表 (2014 年 9 月 東京)

10. 亀井飛鳥

オミクス解析からみるタンパク質・アミノ酸栄養効果と皮膚機能

日本アミノ酸学会第 8 回学術大会 (2014 年 11 月 東京)

11. 近藤 隆、近藤 香、古関明彦

遺伝子発現調節の際の染色体高次構造形成における異性型 PRC1 の関与

第 37 回日本分子生物学会ワークショップ (2014 年 11 月 神奈川)

12. 亀井飛鳥

食品の機能性評価 - 遺伝子発現解析からのアプローチ

名古屋大学農学部セミナー (2014 年 12 月 愛知)

13. 篠崎文夏、亀井飛鳥、渡部由貴、安岡顕人、近藤 香、荒井綜一、近藤 隆、阿部啓子

高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与の影響

日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015 年 3 月 岡山)

【特許】

国内特許出願 1

短期集中型実用化プロジェクト

オンチップ・セラミクスプロジェクト

オンチップ・セロミクスプロジェクト

プロジェクトリーダー 安田 賢二

【基本構想】

平成 20 年度より開始した 4 年間の創造展開プロジェクトの中で開発を推進した 1 細胞分子計測技術の各要素技術開発に関する成果を受け、平成 24 年度よりこれを受け継いでスタートした短期集中型実用化プロジェクトでは、この応用展開として「がん診断」をターゲットとした診断システムの開発を中心に推進している。具体的には、がん転移の早期発見診断、がん細胞種同定による薬物療法診断、術後再発予防診断として展開の可能性がある血中循環がん細胞 (Circulating tumor cell, CTC) の検出技術開発を中心に基礎研究を推進した。

本プロジェクトでは、①サンプル中に存在する微量の標的細胞を特異的に標識することが可能なサンプル前処理プロトコルの開発、②標識を行った細胞を多量の血液中から 1 細胞レベルで高精度に検出し、この標的細胞を高速かつ高収率で回収する技術の開発に加えて、サンプルに全く標識を施すこと無く無染色のまま、細胞の形状情報をもとに標的細胞を発見し回収する細胞認識精製技術の開発、③回収した微量の標的細胞の種類や分子発現状態、細胞機能を 1 細胞単位で解析する技術の開発、④組織切片中のヘテロな細胞集団の中から様々な特徴を持った標的細胞の空間分布を、蛋白質や遺伝子レベルでの分子発現計測により分類同定する技術の開発、の 4 つの課題について研究を推進する。

これらの技術を開発した上で個々の開発要素技術を融合することによって、次世代のがん診断技術に必要な技術の原理開発を進め、実用化に必要な原理技術を確立した上で、産業化の可能性を明らかにすることが本プロジェクトの目的である。

1. 本研究の目的と平成 26 年度の目標

平成 20 年度より開始した 4 年プロジェクトである「1 細胞分子計測」創造展開プロジェクトでは、「ナノメートルスケールでの細胞の発現分子時空間情報の計測」を実現する 1 細胞解析技術の開発と、その解析技術による「生命システムの理解」、「医療・創薬への応用展開」を目標として研究開発を進めてきた。特に、4 年間のプロジェクトを、前半 2 年間は要素技術の原理検証と基本技術の開発、後半 2 年は要素技術の融合と解析技術の完成という 2 段階での研究開発ステップで計画し、その計画に沿って開発を推進した。特にプロジェクト後半 2 年間は、開発した要素技術の応用用途候補として、血中循環がん細胞 (Circulating tumor cells, 以下 CTC) 計測システムの開発を推進した。その開発推進の延長として平成 24 年度より開始した「オンチップ・セロミクス」短期集中型実用化プロジェクトでは、引き続き CTC 計測システムの開発を推進しつつ、産業化への橋渡しのための道標をより具体的に示すべく、各要素技術の課題抽出と解決のための技術評価を進めた。

以下に、短期集中型実用化プロジェクトで設定した 4 つの研究課題と、プロジェクト 3 年目となる平成 26 年度の各研究項目に対する目標を具体的に説明する。

(1) 課題 1 : 標的細胞前処理技術の開発

本課題では、血液中に存在する CTC など、微量の標的細胞を取りこぼすこと無く効率的に発見することが可能なサンプル前処理プロトコルを開発する。多量に存在する不

要細胞の効果的除去技術、標的細胞にのみ標識を施すための標識作製技術と選択的標識技術、さらには回収後の解析を見据えて標識した細胞から標識物を取り除くことが可能な可逆的細胞標識技術について、開発を推進する。

平成 26 年度の目標としては、以下の課題 2 と合わせて血液中の多量の細胞の中から微量の CTC を高精度かつ短時間で検出するための血液サンプル前処理技術の評価を目標とした。

(2) 課題 2 : 標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発

本課題では、蛍光標識による標的細胞の検出に加えて、細胞に全く標識を施すこと無く無染色の状態のまま、細胞の形状情報をもとに標的細胞を同定する技術を開発する。さらに同定のみでなく、発見した標的細胞を高純度で精製する技術についても開発を推進する。

平成 26 年度の目標としては、試作したオンチップ・マルチイメージングセルソータを用いて、がんモデル動物血液中から CTC を効果的に識別検出するための画像指標 (イメージングバイオマーカー) 処理条件の検討と、ソーティング技術によりモデル動物血液中から CTC を精製する技術開発を目標とした。

(3) 課題 3 : 標的細胞機能解析技術の開発

本課題では、回収した微量の細胞に対して遺伝子発現や遺伝子変異、生理機能などの解析を行うことにより、精製した細胞の種類や機能的特徴を特定する技術開発を行う。

特に微量の細胞から効率的かつ高い信頼性で機能解析を行うための、高速遺伝子解析技術開発を推進する。

平成 26 年度の目標としては、超高速 PCR システムの汎用性を高めるために、多数のサンプルの同時増幅が可能となる試料反応部の構造の可能性と限界の評価を行うことを目標とした。

(4) 課題 4 : 組織切片中の 1 細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチラベル技術と電顕技術の開発

本課題では、組織切片中でヘテロに分布する細胞集団中での標的細胞の空間分布を、細胞表面に発現している多数の蛋白質の構成の組み合わせや、細胞内発現遺伝子の組み合わせから、1 細胞レベルで詳細に解析する技術を開発する。このため、ひとつの細胞が発現する遺伝子やタンパク質等の標的分子を金属微粒子で標識し定量同時検出するプロトコルを開発する。

平成 26 年度の目標としては、マルチラベル技術の応用として開発されたカップ形状の磁気微粒子 (magcup) を用いて、標的細胞をサイズ選択的に回収した上で再培養増殖させる技術の確立を、目標とした。

2. 平成 26 年度の研究成果

平成 26 年度目標に対する研究成果の概要を、課題ごとにまとめて報告する。

(1) 課題 1 の成果 : 標的細胞前処理技術の開発

血液中に存在する多数の細胞の中から希少な CTC を取りこぼすことなく検出するためには、なるべく多くの血液を測定する必要がある。マイクロチップを用いてなるべく多くの血液を測定するために、前処理工程において濃縮プロトコルに関する評価を行い、その結果、数 mL 単位の血液を短時間で測定するプロトコルの構築に成功した。また、血液中細胞の細胞核像を明確に取得するために、細胞核蛍光染色プロトコルについて評価を行った結果、血中細胞の細胞核を均一かつ明確に蛍光染色するプロトコルを確立した。その結果、明視野画像イメージングバイオマーカー (細胞面積、周囲長、クラスター化細胞数など) と蛍光画像イメージングバイオマーカー (細胞核面積、核数など) を組み合わせて、多くの血液サンプルを短時間で測定し、CTC を効果的に検出するための準備を整えることができた。

(2) 課題 2 の成果 : 標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発

これまで試作開発に成功したオンチップ・マルチイメージングセルソータを用いて取得した明視野 (細胞全体) および蛍光 (細胞核) 画像からイメージングバイオマーカーを抽出し、CTC を高精度に検出するアプローチに基づき、がん細胞を移植したラット血液をモデルとして CTC 検出精度の評価を進めた。その結果、がん細胞を移植したラット血液中には健常ラット血液に比べて細胞面積や細胞核

面積が大きな細胞が多数含まれていること、また、単一細胞中にも細胞核形状がいびつであったり多様に見える細胞が含まれていることを明らかにすることができた。このうち、細胞面積が大きな細胞画分をオンチップ・マルチイメージングセルソータを用いて精製し、遺伝子変異検査を行った結果、これらが移植したがん細胞であることを特定することに成功した。さらに、面積が大きな細胞画分の詳細な画像解析を行った結果、これらがクラスターを形成しており、このような大きな細胞クラスターはがん細胞を移植したラット血液中にのみ特異的に含まれていることを明らかにすることに成功した。

(3) 課題 3 の成果 : 標的細胞機能解析技術の開発

これまでに我々は、40 サイクルの増幅を 3 分未満で完了することができる循環熱交換型超高速遺伝子増幅装置の開発に成功しているが、本装置の汎用性を高めるために、増幅するサンプルを搭載する部分を広げ、安定な高速熱交換を行うことが可能であるか評価を行った。その結果、一定の面積までのサンプル搭載部であれば、熱交換時の温度ムラは少なく安定しており、また従来のペルチェ型システムなどに比べて高速に熱交換を行うことが可能であることを確認した。さらにサンプル増幅時の蛍光輝度変化を測定する光学系を試作し組み合わせた結果、複数の遺伝子増幅を同時にリアルタイム計測することが可能となった。

(4) 課題 4 の成果 : 組織切片中の 1 細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチラベル技術と電顕技術の開発

マルチラベル技術の応用として、カップ形状超常磁性微粒子 (magcup) を作製することに成功したが、これを用いてサイズが異なるモデルビーズおよび細胞を回収する評価実験を推進した。その結果、magcup 内径より大きな粒子は全く回収されず、作製した magcup がサイズフィルタとして機能することを確認した。さらに、捕獲回収した細胞を培養液中で magcup と共に再培養した結果、細胞が magcup から自発的に抜け出して分裂増殖することを明らかにした。

3. まとめ

以上、平成 26 年度の成果概要をまとめたが、当初研究計画に沿って成果が得られており、今後は試作したシステムを用いて多数のヒト血液サンプル測定を行い、装置の原理検証に加えて、様々な条件下において CTC が如何なる形態で存在するのか、多数の証拠を収集する作業を推進する予定である。最後に、本プロジェクト推進にあたり、精力的に協力して下さった研究補助員の皆様、KAST スタッフの皆様、プロジェクトグループを代表して心より御礼申し上げます。

クラスター化した血中循環腫瘍細胞識別のための オンチップ・マルチイメージングセルソーターの開発

服部 明弘、金 賢徹、松浦 賢志、尾高 正朗、Girault Mathias、安田 賢二

1. はじめに

血液中に異常な細胞が存在しないか調べることは、がんや免疫などの診断において非侵襲な健康診断法として一般的である。例えば、血中循環腫瘍細胞(CTC)は、腫瘍が体内のどこかへ転移する前兆と考えられており、血中のCTCの有無を検出できれば従来の生検法に代わり、人体への侵襲を最小限にする転移がん診断を確立できるものと期待されている。現在、異常細胞を検出する代表的なアプローチとしては、細胞表面の特定の分子を標的とする抗体染色法がある。しかしながら、この方法では標的とする細胞における分子発現の多様性が原因で、正しく検出できないことがある。

この課題を解決するために、本プロジェクトでは異なるアプローチとして、標的細胞の形状から認識するための装置開発を行った。この装置では、細胞試料を小型のチップ内に作製された微小流路内に流しながら高速カメラによって細胞の画像を撮影し、細胞の面積や周囲長といった形状的特徴によって標的細胞を識別するものである。これら形状的なパラメーターは、標的細胞を識別する新たな指標（以後、「イメージング・バイオマーカー」と呼ぶこととする）となる。例えば、巨大化した細胞はいくつかのがん細胞の特徴を示し、また通常細胞と比べて巨大な核や複数の核を持つものは、がん細胞であることを示す一つの特徴的な表現型であることが知られている。したがって、特に細胞の大きさや核の形態、数といったイメージング・バイオマーカーを用いた標的細胞の探索は、がん細胞の識別において有用である。本稿では、細胞全体の形状情報を反映する明視野画像と、核の形状情報を反映する蛍光画像の同時処理を行い、イメージング・バイオマーカーとしてリアルタイム解析するオンチップ・マルチイメージングセルソーター、および血液サンプルにおける異常細胞、特に細胞塊の識別について評価した結果について報告する。

2. 実験と結果

2. 1 マイクロ流路チップの作製

図1に、マイクロ流路チップの概要を示す。実験に用いたマイクロ流路チップは、これまでの研究[1-3]と同様に、以下のような手順で作製した。ガラス基板上に紫外線硬化樹脂を25 μm の均一な厚さになるよう塗布し、紫外線を流

路パターンの形に照射して硬化させ、流路形状以外の部分の紫外線硬化樹脂を取り除き、マイクロ流路の鋳型となる基板を作製した。次に、マイクロ流路チップの本体の基材となる熱可塑性樹脂のペーストを先の鋳型基板上に滴下した後に加熱・硬化させ、マイクロ流路の形状が転写された樹脂シートを作製した。最後に、この樹脂シートに対してサンプルやバッファーの注入口や排出口となる穴を開け、バッファー類を蓄えておくリザーバとするためのプラスチックパイプを樹脂シート上に取り付けてマイクロ流路チップを完成させた。

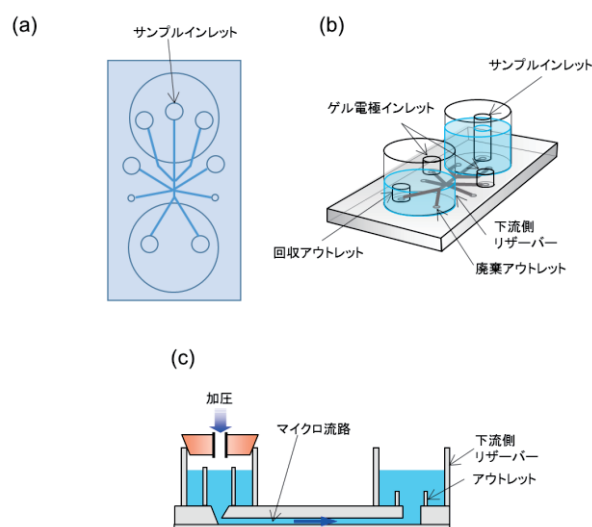


図1 マイクロ流路チップの概要。(a)チップの模式図。チップの大きさは、50mm 開ける 40mm。(b)チップ全体の鳥瞰図。(c)チップの断面図。

2. 2 血液サンプルの精製

本研究では、がんのモデル細胞としてラット前立腺がんの細胞株である MAT-LyLu を用いた。血中にごん細胞を含んだサンプルとするために、まず 5×10^6 個の MAT-LyLu 細胞を 200 μL 調製し、月齢 6 週間の雄コペンハーゲンラットの脊髄皮下組織に移植した。移植して 2 週間後にラットの鎖骨下動脈から血液を回収し、溶血処理を行った。次にリン酸バッファー溶液で洗浄した後、核染色試薬を用いて細胞核を染色し、再度洗浄した上で 5% グルコース溶液中に懸濁して血液サンプルとした。

2. 3 フローサイトメトリー

調製後の血液サンプル 50 μ L をマイクロ流路チップのサンプル注入口に分注し、血液サンプルの調製で用いた 5% グルコース溶液をシースバッファとして、マイクロ流路チップ上のシースバッファ用注入口に分注した。次に、シリンジポンプを用いてサンプル注入口およびシースバッファ注入口に対して圧縮空気によって同時加圧すると、マイクロ流路が上記溶液で満たされて細胞が流路中を流れるので、流路中の流速を 3mm/秒に調整し、200 フレーム/秒で高速撮影した。

2. 4 オンチップ・マルチイメージングセルソーター

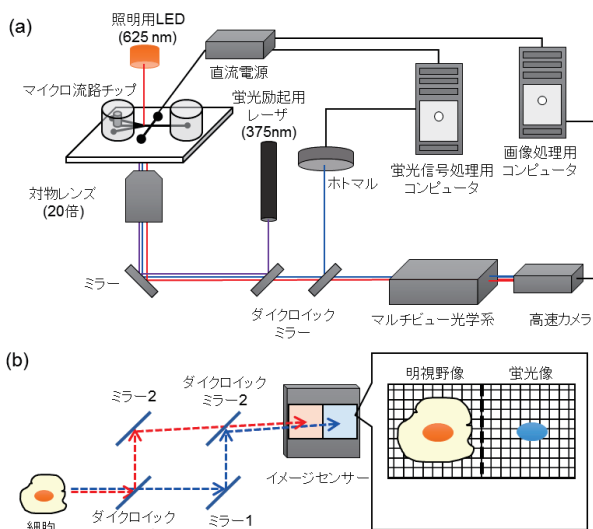


図2 オンチップ・マルチイメージングセルソーターの構成。(a) 装置全体の模式図。(b) 明視野/蛍光マルチイメージングの原理。マルチビュー光学系内のダイクロイックミラーによって明視野像の光路(赤)と蛍光像の光路(青)が分離され、高速カメラのイメージセンサー上に並べて投影される。

図2(a)に、オンチップ・マルチイメージングセルソーターの概要を示す。明視野観察用照明光源は、波長 625nm の LED がマイクロ流路チップの上方に配置し、流路中を流れる細胞に対して透過照明を行えるようにした。LED の波長が核染色された細胞からの蛍光波長と大きく離れているために、明視野と蛍光の同時観察を行っても蛍光画像に影響が及ばないようになっている。装置には、倍率 20 倍の対物レンズが組み込まれており、0.75 の開口数を有するため明るく解像度の高い画像を撮影することができる。装置には蛍光励起光源として 375nm レーザを搭載し、さらにホトマルを組み込んだ。これにより、画像だけでなく蛍光信号も検出でき、従来のバイオマーカーを用いての蛍光検出にも用いることができるようにした。制御

系としては、2つの独立したコンピュータを用い、ひとつは蛍光信号の演算用で 10,000 回/秒の処理が、そしてもうひとつはマルチビュー光学系で得られたイメージング・バイオマーカーの処理用で、細胞を 200 フレーム/秒で明視野ならびに蛍光像として撮影し、リアルタイム画像処理によって明視野像からは細胞の面積と周囲長を、そして蛍光像からは核の面積と個数を算出できるようになっている。図 2(b)はマルチビュー光学系によって細胞の明視野ならびに蛍光像が同時に得られる原理を示したもので、光学系内のダイクロイックミラーによって明視野像と蛍光像を構成する波長成分を分離し、高速カメラのイメージセンサー上に並べて投影することで実現している。

2. 5 イメージング・バイオマーカーによるがん移植ラットの血中細胞塊の識別

イメージング・バイオマーカーによる標的細胞の識別を定量的に評価するため、ラット前立腺がんの細胞株である MAT-LyLu を移植したラットの血液をモデルサンプルとして実験を行った。図3および図4は、がん細胞を移植したラットの血液サンプル (N=4375)、および健康ラットの血液サンプル (N=1599) における細胞の合計面積 (S)、および核の合計面積 (S_n) のヒストグラムである。これらの結果から、2つのしきい値が設定できることがわかった。すなわち、細胞の面積が 140 μ m² より大きいもの、そして核の面積が 80 μ m² より大きいものは細胞塊であった。また、細胞の面積が 200 μ m² を超えるもの、そして核の面積が 90 μ m² を超えるものは、がん移植ラットの血液サンプルにのみ見られ、多くの場合、4 個以上の細胞で構成される特徴を持つことが分かった。

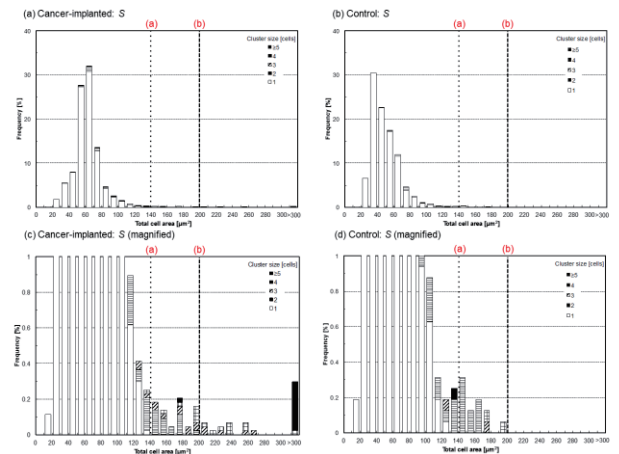


図3 がん移植ラットと健康ラットの血液サンプルにおける細胞の合計面積 (S) のヒストグラム。

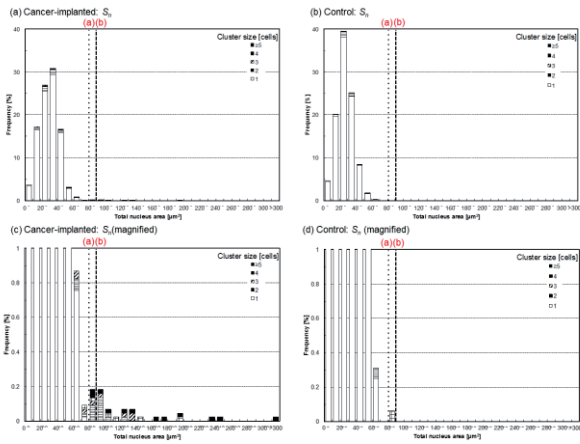


図4 がん移植ラットと健常ラットの血液サンプルにおける核の合計面積 (S_n) のヒストグラム。

一方、システムで撮影された細胞画像を、そこに含まれる核の個数 (N_n) に着目して詳細に解析した結果、図 5(a) に示すように、健常ラットの血液サンプルにおいて 99% を超える画像では核は 1 つのみであり、4 個以上の核を持つものは含まれていなかった。そして、図 5(b) に示すように、がん移植ラットの血液サンプルでは細胞塊が大きくなるほど多くの核が含まれていることが分かった。このように核の個数は、細胞塊を識別するための有力なイメージング・バイオマーカーとなることが分かった。しかしながら、がん移植ラットの血液サンプル中には、単一細胞で複数の核を有するものも存在するため、核の個数のみで細胞塊を判定するには不十分である。そこで新たに周囲長比 (R) というイメージング・バイオマーカーを定義して評価を行った。 R は、細胞の実際の周囲長と、細胞と同じ面積を持つ円の周囲長との比を取ったものとして定義した。低い R の値は、細胞の形が真円からより歪んでいることを意味する。このことはすなわち、細胞塊であることが期待される。図 6 は、がん移植ラットの血液サンプルにおける R の平均値と細胞塊の大きさの関連性を示したものである。単一細胞では R が 0.9 より大きく、 R が 0.9 未満の場合は細胞数が 2 個以上の細胞塊であった。以上の結果から、4 個以上の細胞で構成され、4 個以上の核を持つ大きな細胞塊はがん移植ラットの血液サンプルにのみ含まれ、 R が 0.9 未満であることが明らかになった。

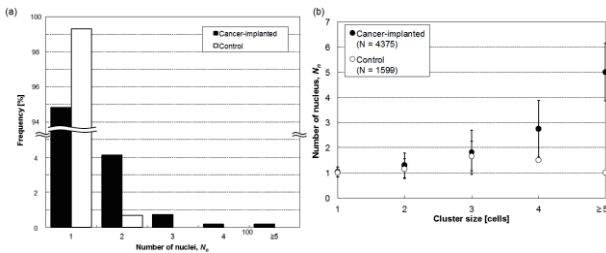


図5 核の個数 (N_n) についてのまとめ。(a)がん移植ラットおよび健常ラットの血液サンプルにおける N_n のヒストグラム。(b) N_n と細胞塊の大きさとの関係。

3. 考察及び今後の展望

本研究では、明視野像および蛍光像の同時イメージングによりソーティング可能なオンチップ・マルチイメージングセルソーターの開発を行い、4つのイメージング・バイオマーカー、すなわち、細胞の面積、核の面積、核の個数、そして周囲長比について、ラット血液中に含まれる細胞塊の識別評価を実施した。その結果、これらイメージング・バイオマーカーが血中のがん細胞塊の識別に有効であることが確認出来た。今後の展望としては、識別した細胞塊に発現している遺伝子を詳しく調べると共に、がん細胞塊が巨大化するダイナミクスを明らかにするために、がん細胞を移植してからの経時的な計測に取り組む予定である。

【参考文献】

1. A. Hattori, K. Yasuda, *J. Appl. Phys.*, 49, 06GM04, (2010).
2. A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Odaka, M. Girault, K. Matsuura, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 06JL03, (2014).
3. F. Nomura, T. Kaneko, A. Hattori, K. Yasuda, *J. Bioprocess. Biotech.*, S3, 003 (2011).

血液中の単一がん細胞を認識するための

イメージングバイオマーカーの評価

尾高 正朗、金 賢徹、Girault Mathias、服部 明弘、
松浦 賢志、寺菌 英之、安田 賢二

1. はじめに

血液中を循環しているがん細胞は、循環血中腫瘍細胞 (Circulating tumor cell, CTC) と呼ばれ、転移が進むがんでは、血中にがん細胞が存在すると考えられている [1]。したがって、末梢血液のがん細胞を正確に同定することは、低侵襲性がん診断が可能になると考えられている。この目的のために、既に多数のアプローチ方法が開発され、実際に診断に用いられ始めている。例えば、標的分子バイオマーカーの検出です。しかしながら、この方法では既知となったバイオマーカーのみに有効である。

一方、我々は細胞自身を検出するオンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムを開発し、形態学的特徴、イメージングバイオマーカーに基づいて、細胞を視覚的パラメータで同定する技術を開発している [2]

(図 1 a, b)。この技術は従来の分子バイオマーカーだけでは同定できないクラスターした細胞を見出すことができ、実際に、このオンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムで、ラット前立腺がん細胞株 (MAT-LyLu) を移入したがん転移のモデルラットの血液中からクラスターした細胞の同定に成功している [3]。本研究では、この研修成果を補完するため、血液中の単一がん細胞の同定方法を 3 つのサンプル (通常血液: Normal、培養がん細胞: Cancer、および培養がん細胞移入血液: Cancer-implanted) で比較して評価した。

2. 実験と結果

2. 1 マイクロチップの試作

本研究で利用したオンチップマルチイメージングフローサイトメトリーシステムのためのマイクロチップは、高さ $25\mu\text{m}$ のマイクロ流路が転写し、硬化したポリジメチルシロキサン (PDMS) をカバーガラスに貼り付けて作成した (図 1 c, d)。

2. 2 マイクロチップの試作

用いた培養がん細胞は、ダニング R3327 腫瘍から確立された MAT-LyLu を利用した。この細胞をペニシリンおよび

ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清存在下の RPMI 1640 中で、 37°C 、5% CO_2 で培養した。

健康ラットと培養がん細胞を移入したラットの血液 (通常血液、または培養がん細胞移入血液) は、神奈川県立がんセンターの動物実験委員会によって承認された手順に従って、採血された血液を利用した。これらの血液サンプルを溶解試薬で赤血球を溶血し、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁したものを利用した。オンチップマルチイメージングフローサイトメトリーシステムで細胞核を可視化するためにヘキスト染色試薬で細胞核を染色した。

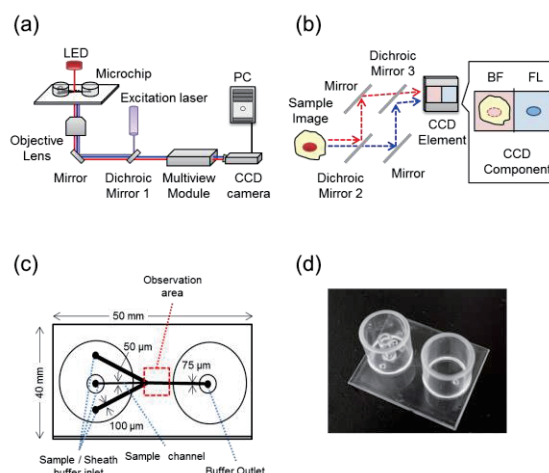


図 1 オンチップマルチイメージングフローサイトメトリーシステムの概要 (a) システムの概要、(b) マルチビューモジュールの光路図、(c) マイクロチップの流路のデザイン、(d) マイクロチップの写真。

2. 3 フローサイトメトリーの手順

シース緩衝液として 1%BSA/PBS を用いて、調製したサンプルをマイクロチップに注入した。その後、空気圧を上げてサンプルをマイクロ流路に流し込み、測定を行った。測定は、明視野 (BF) 及び蛍光 (FL) 画像の両方を取得するために、マルチビューユニットを通して 200 FPS のカメラ設定で画像を撮影した。3 つのサンプル、通常血液、培

養がん細胞、および培養がん細胞移入血液を本装置で、同一条件可下で測定した。

2. 4 画像データ分析

8つのイメージングバイオマーカーとして、細胞面積 (S_C)、細胞核面積 (S_N)、細胞核面積と細胞面積の比 (S_N/S_C)、細胞重心と細胞核重心の距離 (D)、細胞周囲長 (P_C)、細胞核周囲長 (P_N)、細胞と細胞核の面積 ($S_C \cdot S_N$) から計算される周囲長とそれぞれの実測値 ($P_C \cdot P_N$) との比率、 R_C と R_N 、(ここで、周長比 R_X ($X=C, N$) は、真円度を示す。つまり、 $R_X=1$ 粒子が真である場合に円) を算出し、評価した。3つのサンプルの測定で、得られた単一細胞のみが認識されている画像を各サンプルについて 100 画像以上を今後の解析に利用した。

得られた単一細胞のみが認識されている画像とそれらのイメージングバイオマーカー値を図2に示す。さらに、3つのサンプルごとに S_C と S_N の相関図を図3に示した。これより、培養がん細胞は、細胞面積と細胞核面積の相関図より、通常血液中の細胞から明確に区別が可能となった。

また、詳細検討のため2つのカテゴリーに大別した。カテゴリー-I は $S_C \leq 58 \mu\text{m}^2$ 、 $S_N \leq 43 \mu\text{m}^2$ で、カテゴリー-II は、 $S_C > 58 \mu\text{m}^2$ 、 $S_N > 43 \mu\text{m}^2$ (それぞれの数値は通常血液の細胞の最大値) に分類し、それぞれの統計値を表1にまとめた。

ID	BF	FL	S_C μm^2	S_N μm^2	S_N/S_C	D μm	P_C μm	R_C	P_N μm	R_N
normal	a		36.2	17.9	0.50	5.9	21.9	0.97	15.4	0.98
	b		43.0	31.2	0.73	2.7	23.7	0.98	20.6	0.96
	c		48.6	43.3	0.89	2.9	25.5	0.97	24.1	0.97
cancer	d		109	99.4	0.91	0.49	39.5	0.94	37.2	0.95
	e		115	50.2	0.44	2.4	39.0	0.97	26.6	0.95
	f		173	103	0.60	2.3	47.8	0.98	38.9	0.92
	g		248	102	0.41	2.2	57.3	0.98	37.7	0.95
	h		277	159	0.57	1.5	61.7	0.96	46.5	0.96
	i		274	48.1	0.18	0.60	60.3	0.97	28.5	0.86
cancer-implanted	k		26.4	19.7	0.75	2.0	18.9	0.96	16.2	0.97
	l		51.2	30.9	0.60	1.3	26.2	0.97	20.8	0.95
	m		84.9	49.3	0.58	1.6	33.7	0.97	25.7	0.97

図2 典型的な単一細胞画像とイメージングバイオマーカー値 (a-c) 通常血液、(d-j) 培養がん細胞、(k-m) 培養がん細胞移入血液。白バーは $10 \mu\text{m}$

また、バイオイメージングマーカーの有力な候補である S_N/S_C 、 D 、 R_C 、 R_N について3つのサンプルのヒストグラム分析を図4に行った。これより S_N/S_C 、 D 、 R_C は3つのサンプルで有意な差は認められないが、 R_N は培養がん細胞の一部で0.9よりも小さいものが認められた。

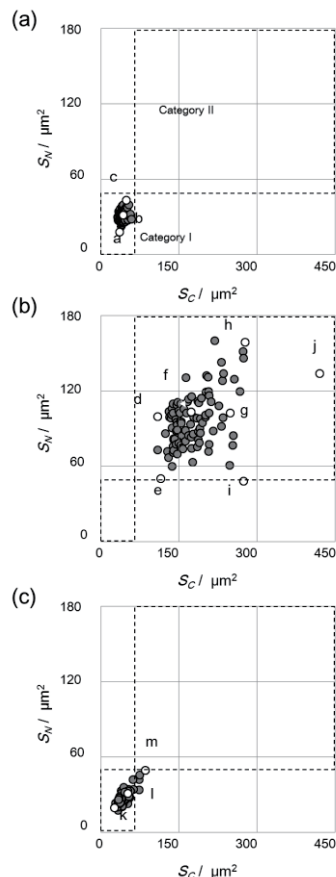


図3 細胞面積と細胞核面積の相関図 (a) 通常血液、(b) 培養がん細胞、(c) 培養がん細胞移入血液。図2中の ID 対応するドットを白色点として示す。

表1 イメージングバイオマーカー値

	Number	Cellular area	Nuclear area	Area ratio	Distance of mass center	Cellular Perimeter	Cellular Perimeter ratio	Nuclear Perimeter	Nuclear Perimeter ratio	
		(S_C) μm^2	(S_N) μm^2	(S_N/S_C)	(D) μm	(P_C) μm	(R_C)	(P_N) μm	(R_N)	
Normal	Mean	43	31	0.74	2.9	24	0.97	21	0.96	
	S.D.	5.2	4.0	0.11	0.87	1.4	0.0083	1.4	0.016	
	Median	43	31	0.75	2.8	24	0.97	21	0.97	
	Max	58	43	0.99	5.9	28	0.98	24	0.99	
	Min	32	18	0.48	1.0	21	0.93	15	0.91	
Cancer	Mean	180	97	0.56	1.7	49	0.97	38	0.92	
	S.D.	48	22	0.13	0.78	6.3	0.0088	4.0	0.035	
	Median	170	96	0.55	1.7	48	0.97	38	0.93	
	Max	421	160	0.91	3.8	77	0.98	47	0.97	
	Min	109	48	0.18	0.28	38	0.92	27	0.82	
Cancer-implanted	Mean	44	28	0.64	1.4	24	0.97	19	0.96	
	S.D.	10	5.1	0.087	0.31	2.6	0.0099	1.8	0.017	
	Median	42	27	0.64	1.4	24	0.97	19	0.97	
	Max	85	49	0.84	2.4	34	0.99	26	0.98	
	Min	26	17	0.44	0.55	19	0.92	15	0.91	
Cancer-implanted	Category I	Mean	42	27	0.65	1.4	24	0.97	19	0.96
	S.D.	6.6	3.6	0.086	0.29	1.9	0.010	1.3	0.016	
	Median	42	27	0.64	1.4	24	0.97	19	0.97	
	Max	56	36	0.84	2.0	28	0.99	22	0.98	
	Min	26	17	0.44	0.55	19	0.92	15	0.91	
Cancer-implanted	Category II	Mean	80	48	0.60	1.5	33	0.97	25	0.97
	S.D.	7.1	2.6	0.021	0.11	1.3	0.0031	0.67	0.0031	
	Median	80	48	0.60	1.5	33	0.97	25	0.97	
	Max	85	49	0.61	1.6	34	0.97	26	0.97	
	Min	75	46	0.58	1.4	32	0.96	25	0.97	

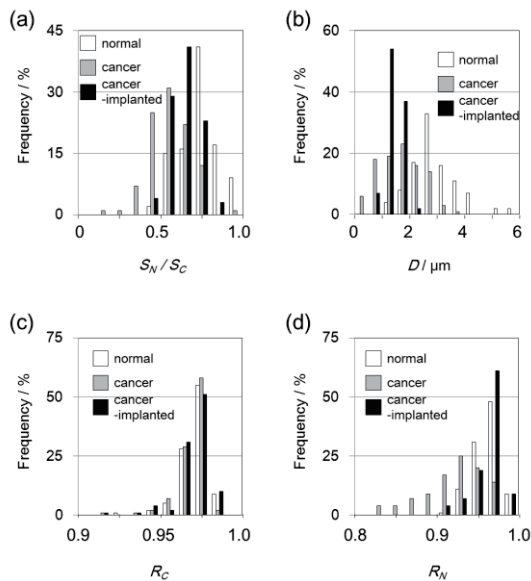


図4 ヒストグラム分析 (a) 細胞核面積/細胞面積の比、(b) 細胞重心と細胞核重心の距離、(c) 細胞、(d) 核の面積から計算される周囲長とそれぞれの実測値との比 R_C と R_N 。

3. 考察及び今後の展望

以上の結果より (1) 培養がん細胞は、細胞面積と細胞核面積の相関図より、通常血液中の細胞から明確に区別することができ、(2) 細胞核面積と細胞面積の比、細胞重心と細胞核重心の距離、細胞の真円度を示す比率 R_C は 3 つのサンプル間で有意な差はなく、(3) 培養がん細胞の一部は R_N が 0.9 よりも小さかった。これらの結果は、イメージングバイオマーカーの測定で、血液中のがん細胞を同定できる可能性を示す。したがって、我々はこのバイオマーカーを応用し、セルソーティング機構を組み込み、これらの細胞を分取する装置の開発に取り組む予定である。

【参考文献】

1. N. Aceto, A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber, and S. Maheswaran, *Cell*, 158, 1110 (2014).
2. A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Odaka, M. Girault, K. Matsuura, and K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 53, 06JL03 (2014).
3. H. Kim, H. Terazono, Y. Nakamura, K. Sakai, A. Hattori1, M. Odaka, M. Girault, T. Arao, K. Nishio, Y. Miyagi, and K. Yasuda, *Plos One* 9, e104372 (2014)

Controls of pressure-driven micro-droplet formation and optimum encapsulation in microfluidic system

Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, and Kenji Yasuda

1. Introduction

As a part of the on-chip cellomic project, a complementary microfluidic method was investigated in order to compartmentalize sample into constant volume. To reach this goal, we examined the creation of reproducible water-in-oil droplets able to encapsulated object such as cell clusters. In the literature, the formation and encapsulation of objects are often limited to the random case and can be modelled by using the Poisson's distribution. This approach expects that the flow in the channel prior to encapsulation can carry objects without sedimentation. However, this statement is often violated in the low range of pressures and contributes to separate encapsulation and sorting chips to overcome this phenomenon. Although the sedimentation was not fully investigated by comparison to other parameters such as droplet speed or sorting mechanisms, it appeared to be crucial that the development of integrate chip needs a better characterizing of the range of pressures and an exploration of the relationships between parameters monitored in 'real-time' and the flow pattern.

In this context, we investigated a method using a pressure-controlled system in order to create an emulsion of homogenous micro-droplets able to contain objects with a diameter size up to 20 μm . This study also describes the different flow regimes with a particular focus on the generation of stable droplet flow, needed to develop sorting microfluidic applications. This detailed approach could lead to find the most suitable experimental setting able to control the encapsulation of object in a stable droplet flow.

2. Material and methods

A dual pumps system composed of two independent compact air cylinders was used to generate the droplet by flow focusing an aqueous stream with two streams of fluorinated oil containing a surfactant. All pressures are reported relative to the atmosphere. Inverted microscope equipped with a CMOS camera

was used to capture digital images during droplet formation. This camera was connected to the computer where LabVIEW 2013® software was installed. The stable droplet flow pattern is defined as a single droplets flow centred in the microchannel and moving linearly through the channel. In contrast, the unstable droplet flow is defined as multiple flows of droplets which linearly or not moved in the microchannel.

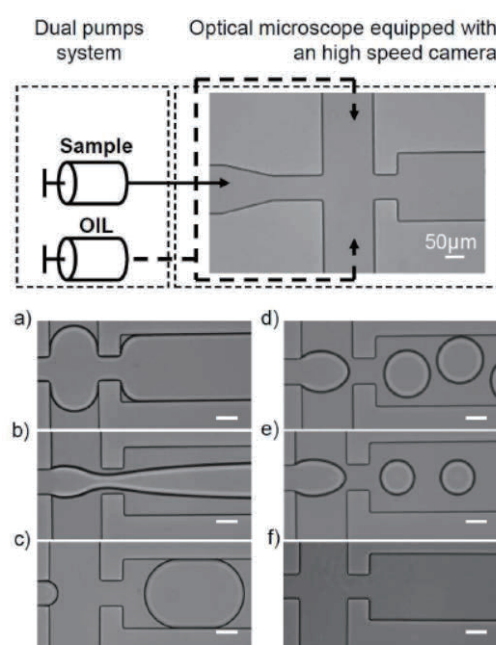


Figure 1: Schematic drawing of the experimental devices and pictures of the six different flow regimes (scale bar 50 μm). (a) is the micrograph of the channel filled with sample (sample only), (b) an annular flow pattern, (c) the droplet with diameter size higher than the channel width (plug pattern), (d) the unstable droplet pattern where the droplets are not centred in the channel, (e) the droplet centred in the channel (stable droplet pattern), (f) shows the channel only fill with oil (oil only).

3. Results and discussion.

3.1 A competition between the inertial and the viscous forces in a fixed geometry

By using the dual pump system, combinations of 400 different pressures were measured and the associated two-phase flow patterns were recorded. Flow patterns were discriminated into six different

cases characterizing either droplet types or single phase flows (Figs. 1, 2). Then, droplet flow types

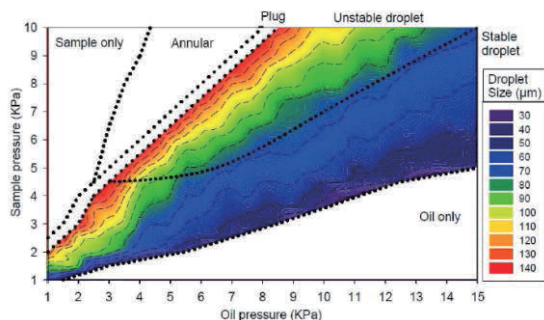


Figure 2: Relationship between droplet shape and the pressures applied on the sample and oil inlets. The different flow regimes observed in the range of pressure used were delimited by the black dotted lines.

were categorized into stable and unstable droplet patterns (Figs. 1d and 1e, respectively). Among the different flow regimes, the minimum droplet size ($\approx 30 \mu\text{m}$) of the chip was slightly smaller than the flow focusing contraction width ($50 \mu\text{m}$) and indicated the strong geometry dependence in the pressure-controlled system. Moreover, results showed that the droplet diameter was limited to $\sim 70 \mu\text{m}$ in the stable droplet regime flow at the frequency higher than 2 Hz. The specific diameter of the droplet corresponding to the half of the channel could be linked to the change in dominant force between the inertial and the viscous forces¹⁾. In this context, calculations of the Re numbers were performed according to the geometry of the microfluidics devices in view to verify if any possible increases of the Re numbers can describe any change in the flow regimes. With a Re number lower than 0.5, the flow should be laminar in the channel and droplets are expected to move straight through the channel. As unstable flow was observed, this result suggested that flow regime can not only depend on the formation area but also to the subsequent parts of the microfluidic device. This integrative approach was in agreement with the study of Lee et al. (2009)²⁾ which reported that droplet formation could depend on either the upstream geometry and associated flow field or the geometry and flow field in the downstream channel. Consequently, our results indicated that precise control of the droplet flow type can be reached by taking into account the entire geometry of the channel and illustrated the complexity of

the flow type prediction based on the single Reynolds number value calculated at the droplet formation area. As we observed that the Re numbers can not easily describe the change between the stable and unstable droplet flows, additional indexes were investigated to better identify the range of stable droplet domain.

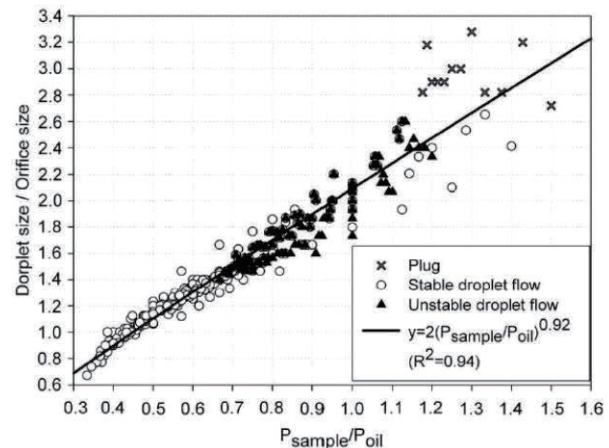


Figure 3: Relation between the droplet to the orifice size of the sample channel and the sample to oil pressures. The cross symbols are the plug flow regime (fig. 1c), the white circles are the stable droplet pattern (Fig. 1d) and the black triangles shows the unstable droplet pattern (Fig. 1e). The black line is the power regression curve calculated using the entire data set ($n=382$).

3.2 Limit between the stable and unstable droplet flows

Abrupt change between the stable and the unstable flows is difficult to quantitatively describe in the small channel because of the lack of velocimeter that can measure turbulence in microchannels without beads addition. This limit is also particularly important for common microfluidic applications, where the position of object must follow a specific path through the channel such as in sorting experiments³⁾. The figure 4 shows the droplet speed at different constant oil pressures depending on the pressure ratio $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$. By fixing the oil pressure and increasing the dispersed phase fluid, the hydrodynamics of the two phases flow was characterized by two phases, i) a first phase, where the droplet speeds were nearly constant or tended to decrease (up to $200 \mu\text{m s}^{-1}$, oil pressure: 15 kPa), and ii) a second phase, where a sudden increase of speeds were measured between $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ 0.6 and 0.8. Excepted for the oil pressures equalled to 11.5 to 12 kPa, these two phases characterized by a minimum of the droplet speed mainly ranged between $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ equal

0.6 and 0.8 correspond precisely to the transition between the stable and the unstable droplet flow regimes. The critical value of the minimum of the droplet speed also suggested that the increase of pressure on dispersed phase not necessary led to an increase of droplet speed moving through the channel.

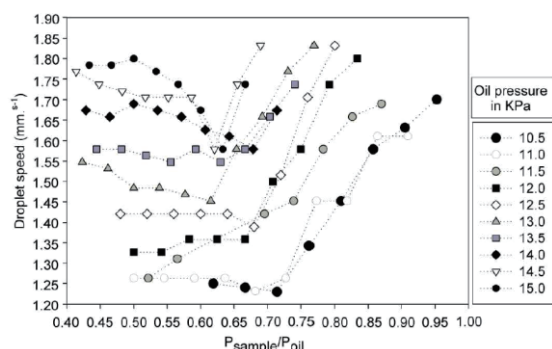


Figure 4: Droplet speed (mm s⁻¹) at different constant oil pressures (kPa) depending on the pressure ratio $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$.

3.3 The suitable flow regime for encapsulation

The percentage of encapsulation of the 20 μm beads depending on the pressures ratio $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ is shown in Fig. 5. The percentage of encapsulation is characterized by a drastic increased (0-100 %) in the stable droplet phase. This rapid increase was found in the range of pressure lower than 0.1 kPa which is the detection limit of the pressure sensor. The limit between the oil-only flow and the stable droplet regimes shows the lower percentage of droplet encapsulation (0 %) when the oil pressure was maintained either at 5 kPa or 10 kPa.

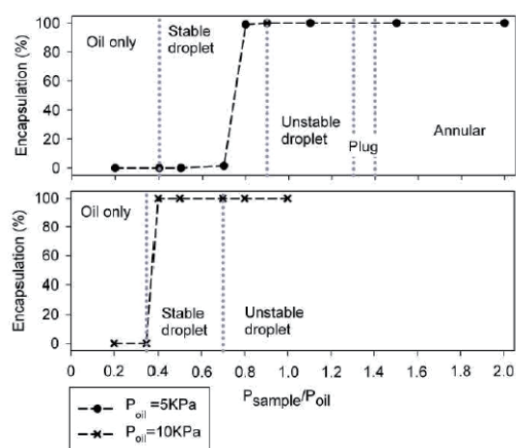


Figure 5: Encapsulation of 20 μm standard beads (%) depending on the ratio $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$. The upper (black dots) and the bottom panels (black crosses) are the encapsulation of beads

when P_{oil} was fixed to 5 kPa and 10 kPa, respectively. The dotted gray lines show the limit between the different flow regimes.

In contrast, the limit between the stable and unstable droplet regimes was characterized by the higher encapsulation percentage ($\sim 100\%$). These results indicated that the most robust encapsulation of the beads 20 μm (high frequency and the speed of droplets) was found in the higher $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ ratio and suggested that the higher $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ ratio of the stable droplet regime located near the limit stable-unstable droplet flow regimes appeared to be the most suitable range of pressures for the sorting experiment using our microfluidic device.

4. Conclusions

By using a pressure-controlled flow focusing device two single phases and four different multiphase flow regimes were observed and their conditions were examined. Although the Reynolds number was always lower than 1 in the droplet formation area, unstable droplet regime flow was observed and suggested that in addition to the viscosity, the channel geometry in small microfluidics is important and should integrate the entire chip design either than a single section. Results also highlighted that the limit between the unstable and stable droplet regimes was the most suitable for sorting application due to the compromise between the droplet size, frequency, distance between two consecutive droplets and encapsulation of beads. The limit can be detected using the drastic change of the droplet speed found at the threshold between the two regimes. Finally, our results showed that the increase the sample inlet pressure not necessary increases the droplet speed underlying the difference in speed between the carrier fluid and the droplet flow. The detailed version of this study was submitted to the Journal of Nanobiotechnology.

References

1. J.F. Edd, J Di Carlo, K. J. Humphry, S. Köster, D. Irimia, D.A. Weitz, M. Toner, *Lab Chip*, 8:1262-1264, (2008).
2. W. Lee, L.M. Walker, S.L. Anna, *Phys. Fluids*, 21:032103, doi: 10.1063/1.3081407, (2009),
3. L. Mazutis, J. Gilbert, W.L. Urig, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, J.A. Heyman, *Nat. Protocols*, , 8: 870-891, (2013)

超音波放射圧による生体微粒子ハンドリング

松浦 賢志、野村 典正、金 賢徹、寺 蘭 英之、服部 明弘、安田 賢二

1. はじめに

非接触で微粒子を制御する光ピンセットなど、光波あるいは音波などの波動を利用した技術が μm サイズの微小な空間で利用されている。そして機械的に直接把持することができないような微小な世界で起きているタンパク質 1 分子の発生力の計測や微細加工技術で作られた微小空間内の微粒子の運搬や精製などに利用されはじめています。

超音波放射圧の特長は、(i) 溶液中に μm ~ mm スケールの幅広いポテンシャル勾配を形成することが可能であること、(ii) 音場を発生させるための装置構成(圧電体素子、表面弾性波デバイスなどの超音波音源の構造)が簡素であること、(iii) 素子の形状を自在に変化させることで柔軟にシステムに組み込めること、(iv) 電氣的に簡単に動作を制御することができること、(v) 歯車や軸などの機械的駆動部を全く必要としないこと、(vi) 用いる超音波は縦波のため容易に位相・周波数の異なる複数の超音波を重ね合わせることが可能であることなどである。

これらの特長を用いれば微小容器内の懸濁液中の微粒子を超音波の放射圧によって非接触に捕獲したり、あるいは特定の方向に配列、配向させることができるだけでなく、従来の光ピンセット等の技術では難しかった、広い mm 程度のポテンシャル場を利用して流路を流れてくる微粒子を連続的に濃縮したり、あるいは、超音波の放射圧と静電力などのほかの力との拮抗を利用した分画技術への応用が可能となる。本稿では、我々が開発した超音波放射圧の生体試料への応用の可能性について報告する。

2. 超音波ハンドリング

2. 1 μm サイズの微粒子が受ける超音波放射圧

定在波中での超音波放射圧は微粒子の粒径の3乗に比例して減少してゆき、最終的にはブラウン運動のために捕獲できなくなってしまうが、果たして μm サイズの微粒子の場合であっても同様な結果が得られるのであろうか。

実際にポリスチレン微粒子を用いて一定強度の超音波源から照射される超音波に対する超音波放射圧の粒径依存性を調べてみると面白いことがわかった。すなわち微粒子の粒径が μm 領域になると微粒子の受ける力の減少の割合が減ってきて、一定の値に漸近するのである(図1)。原因は、粘性流体の効果によって微粒子の粒径が μm 以下になるといわゆる粘性流体の殻が微粒子の受ける超音波放射圧の強さを増幅するためと考えられる。例えば粘性流体の境界層の厚さ h を考えると、以下の(1)式が成り立つ。

$$h = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho\omega}} \quad \dots (1)$$

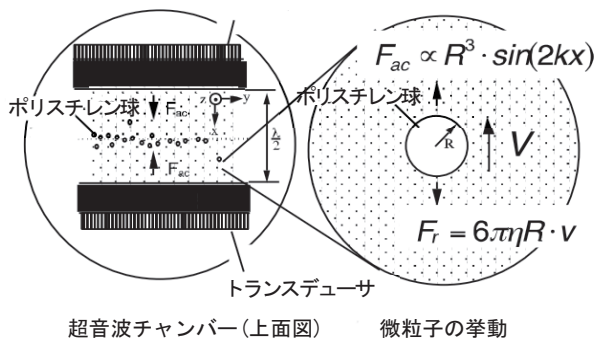
例えば 500kHz の定在波のとき、微粒子を取り囲む水の殻の厚さは $0.8\mu\text{m}$ 程度である。ただし、 η は水の粘性係数である。

これは、実験結果($1.5\mu\text{m}$)に近い値であり、 mm サイズの大きな微粒子では影響が無視できるが、数 μm 程度の粒径の微粒子で初めて観察できるものである。従来、超音波放射圧は微粒子の粒径の3乗(体積)に比例して急激に減少するため、 μm 未満の小さな微粒子は捕獲が難しいと考えられていたが、この効果によって超音波放射圧は理論で予測されていた粒径より小さい微粒子を効果的に捕獲することが可能であることが示唆された。また蛍光色素のような分子量数百程度の小さな分子に対して超音波放射圧がどのような効果をもたらすかも検討され、超音波の放射圧によって蛍光色素のような蛍光高分子も超音波放射圧の力を受けて分散することも明らかにした。

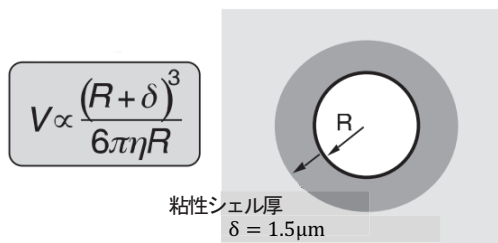
2. 2 定在波を用いたDNA濃縮・血球濃縮

定在波中での微粒子捕獲、濃縮技術は超音波放射圧を用いた微粒子操作技術の中でも最も特徴的なものの一つである。水中での音速は 1500m/s であることから、 1MHz 程度の超音波を用いたときの水中での波長は 1.5mm 、 100MHz の超音波を用いたときに、 $15\mu\text{m}$ となる。このように μm から mm オーダーまでの幅広いポテンシャル場を選択できることが、超音波を微粒子の単なる捕獲技術として用いるだけでなく、幅広いポテンシャル場の裾野によって濃縮を効率的に行うことを可能にしている。たとえば、従来は遠心分離で行っていたDNA分子の捕獲・濃縮も超音波放射圧によって mm オーダーの微小な容器内で同様に行うことができる。

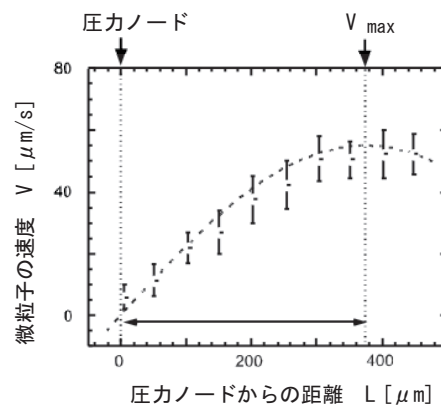
生体物質、とりわけDNAなどの核酸にとって超音波は、その破碎の手段として広く使われてきた。また、超音波放射圧の捕獲力は微粒子が小さくなると微粒子の粒径の3乗に比例して減少してゆき、最終的にはあるサイズまで小さくなったところでブラウン運動に打ち勝つことができなくなり、捕獲出来なくなってしまう。従って顕微鏡でも見ることができないような小さなDNA分子を捕獲するためにはかなり強力な超音波を照射する必要があると考えられる。しかし、実際には、DNAなどの微粒子は疎水会合条件では超音波によって互いに衝突・凝集しながら徐々に巨大な塊となってゆき、最終的には巨大なDNA塊として効率的に濃縮、回収することが可能である。図2が



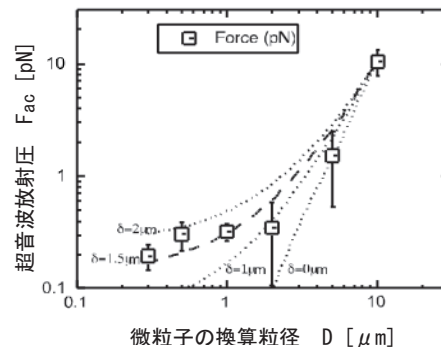
(a) 計測方法



(b) 最大移動速度と換算粒径との関係



(c) 移動速度の空間分布部



(d) 換算粒径と超音波放射圧 F_{ac}

図1 超音波放射圧を受ける微粒子の周囲を囲む流体の殻。定在波中での微粒子の移動速度から微粒子が実際にどの程度の粒径に換算されるかを見積もることができる。その結果、水の殻の影響は粒径が小さくなるほど顕著になり、この例では水の殻の厚さ δ は $1.5 \mu\text{m}$ 程度であると見積もられる。

その例である。実験では、エタノール溶媒中で分子量 2.7 kbp のDNA分子を凝集条件において、周波数 500 kHz の超音波を導入すると、溶液中に分散していたDNAの微小クラスターが定在波の節の位置に進行しながら互いに衝突し、その粒径が徐々に大きくなってゆき、最終的に定在波の節の位置に濃縮されるのが観察される。また超音波照射後DNAは損傷を受けていれば分子量の短い成分が多数発生するはずであるが、電気泳動の結果からキャビテーションが発生しない限りDNAなどの核酸は損傷を受けていないことも確認している(図2)。

この超音波濃縮技術を用いて血液中の赤血球などの生体粒子も損傷をほとんど与えることなく定在波の節の位置に濃縮することもできる。5) このときもキャビテーションが発生しない条件下では赤血球内の成分はほとんど溶出しなことが確認されている。また、定在波に高調波成分を重ね合わせる事で、細胞に損傷を与えることなく濃縮効率を改善することもできることを確認した。

2.3 超音波放射圧と静電気力の拮抗を用いた微粒子分離

微粒子に超音波放射圧を与えるとこれらを濃縮することができることを示してきた。この超音波放射圧にもうひとつ異なる種類の力を拮抗するように加えると、微粒子を

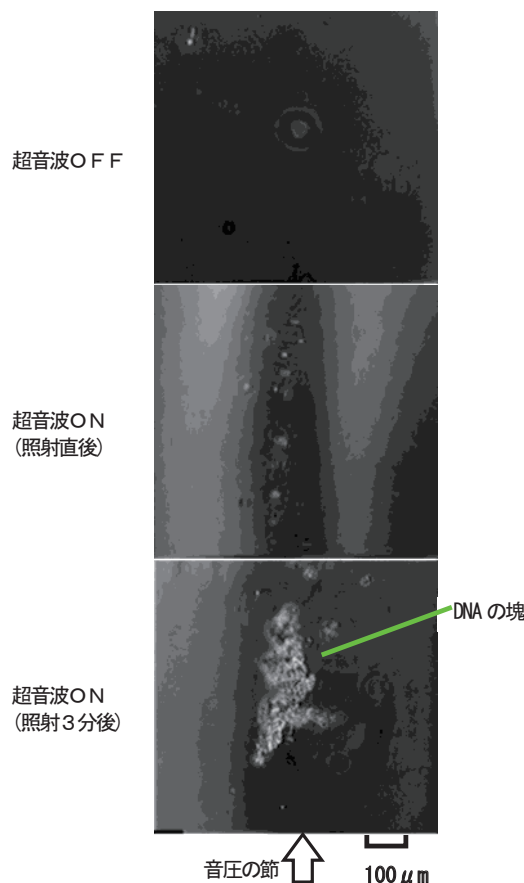


図2 超音波放射圧によるDNA濃縮過程の顕微鏡写真。上図は超音波照射前、中図は超音波照射直後、下図は超音波照射開始3分後のDNAクラスターの分布を示している。超音波照射によって定在波の音圧の節に集まったクラスターが会合して大きくなってゆくの分かる。

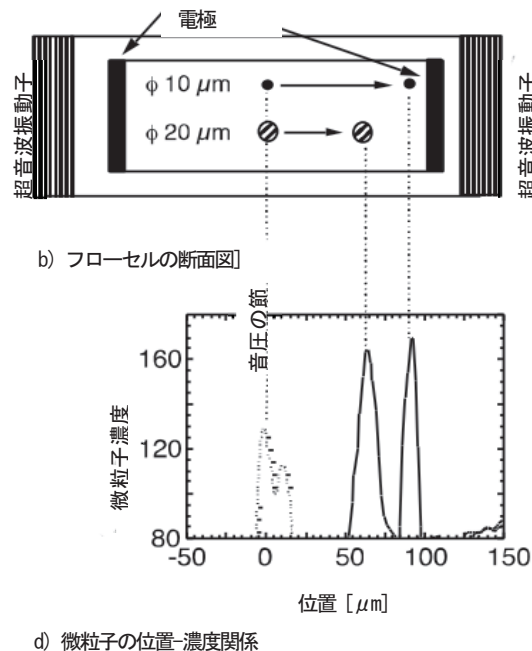
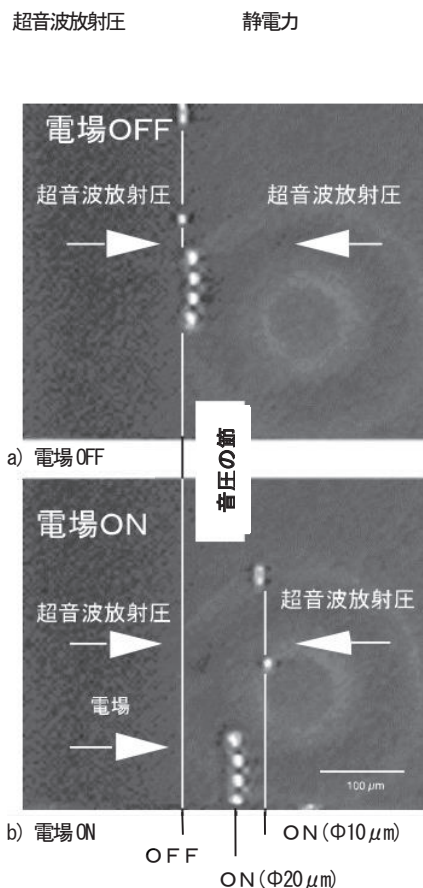


図3 超音波放射圧と静電気力とを用いた微粒子分画。超音波のみを照射したとき粒径 $10\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ の微粒子は、ともに定在波の音圧の節に一直線に並ぶ（上写真 a）、右グラフ d) の点線）。さらに電場を加えると微粒子はその粒径に応じて音圧の節から移動する（下写真 b）、右グラフ d) の実線）。（図中上の (2) 式で R : 微粒子の半径、 k : 超音波の波数、 E_{AC} : 超音波のエネルギー密度、 A : 定数、 x : 微粒子の位置、 ϵ : 溶媒の誘電率、 $1/\kappa$: 微粒子のまわりの電気二重層の厚さ、 Φ_0 : 微粒子の表面の電位、 E_{AC} : 印加する電界強度）

粒径、組成の違いに応じて分離することができるようになる。微粒子が受ける超音波放射圧は、微粒子の密度と圧縮率、そして粒径の3乗に依存して決定するが、これに電場を加えた場合、微粒子はその表面のゼータ電位と粒径の2乗に依存した力を拮抗して受けることとなる。したがって微粒子はその密度、圧縮率、表面の状態（ゼータ電位）、粒径の違いによって異なる釣り合いの位置を持つこととなり、異なる場所に並ぶことで簡単に分離されることになる（図3の数式参照）。

図3は実際に周波数 500kHz の定在波と静電場とを組み合わせると粒径 $10\mu\text{m}$ と粒径 $20\mu\text{m}$ のポリスチレン球を分画した例である。まず超音波のみを照射すると粒径 $10\mu\text{m}$ と粒径 $20\mu\text{m}$ のポリスチレン球はともに定在波の節の位置に一直線に並ぶ。つぎに超音波を照射しながら静電場を印加すると微粒子は粒径の違いに応じて定在波の節の位置から移動し、それぞれの釣り合いの位置に静止する。計算より求めた粒径 $10\mu\text{m}$ のポリスチレン球に対する粒径 $20\mu\text{m}$ のポリスチレン球移動量の比は 0.5 であり、実験結果 (0.6) とほぼ同じ結果となっている。

2. 4 マイクロ加工技術と超音波放射圧とを組み合わせた試料濃縮技術

微粒子に超音波放射圧を与え、これらを濃縮することができることを示してきた。この超音波放射圧にもうひとつ異なる

種類の力を拮抗するように加えると、微粒子を粒径、組成の違いに応じて分離することができるようになる。微粒子が受ける超音波放射圧は、微粒子の密度と圧縮率、そして粒径の3乗に依存して決定するが、これに電場を加えた場合、微粒子はその表面のゼータ電位と粒径の2乗に依存した力を拮抗して受けることとなる。したがって微粒子はその密度、圧縮率、表面の状態（ゼータ電位）、粒径の違いによって異なる釣り合いの位置を持つこととなり、異なる場所に並ぶことで簡単に分離されることになる（図3の数式 (2) 参照）。

3. 考察及び今後の展望

超音波の生体利用の実用化の分野として、微細加工技術と超音波放射圧を組み合わせた濃縮、分離、精製技術の利用が期待されており、キャビテーションが発生しない状況では生体試料のような損傷に敏感な試料であっても安全に操作できることが示唆されている。今後は、いかに効率的にキャビテーションを防ぎながら捕獲・操作できる技術が開発できるか、マイクロ流体デバイスの特徴を駆使した血中がん細胞の捕獲、精製への応用を現在検討中である。

カップ形状超常磁性微粒子“magcup”を用いた サイズ選択的細胞精製技術の開発

金 賢徹、寺菌 英之、竹井 弘之、安田 賢二

1. はじめに

様々な種類の細胞が混在する集団の中から目的の細胞のみを精製する作業は、生命科学研究において最も基本的かつ重要な前処理工程のひとつである。目的細胞を精製するための代表的な方法のひとつはフィルタ濾過法であり、ざるを通して大きな粒子を濾しとるが如く、小さな穴が開いたフィルタ膜に細胞懸濁液を通過させることで、穴の直径より大きな細胞を精製する方法である。簡便であるため広く利用されているが、濾過を行う際に加圧をする必要があり、そのため多数の細胞がシヤアストレスのためダメージを受けるといった問題点がある。一方、別の方法としては細胞表面に発現する抗原分子を標的として、抗原に選択的に結合する抗体を作用させて目的細胞を精製する方法であり、簡便な方法は抗体分子を磁気微粒子表面に予め結合させておいた上で細胞懸濁液と混合し、磁場を作用させて磁気微粒子（の表面の抗体）に結合した細胞を回収することである。抗原-抗体結合反応を用いるので特異性が高く、広く利用されているが、回収対象の細胞の抗原分子が特定されていない場合は適用不可能である。

ここでは、上記フィルタ濾過法のサイズ選択性と磁気微粒子精製法の簡便性の両者を兼ね揃えた、新しい細胞精製技術の開発について紹介する。具体的には、お椀のようなカップ形状の超常磁性微粒子（以下、“magcup”）を作製した上で、magcup 内部の凹面空間に目的細胞をサイズ選択的に捕獲し、磁場を印加することで細胞を回収する技術開発について紹介する。magcup の作製方法と物性については昨年の報告書で詳しく紹介したため割愛し、magcup によるビーズと細胞のサイズ選択的な回収、および回収細胞の再培養結果について報告する。

2. 実験と結果

2. 1 magcup によるビーズのサイズ選択的回収

はじめに、サイズ校正用として広く一般的に利用されているポリスチレンビーズ（CV 値 5%以下）を回収対象のモデルとし、magcup による標的回収のサイズ選択性について評価を行った。図 1 は直径 7 μm から 80 μm の magcup を作製した上で直径 10 μm のポリスチレンビーズと混合し、回収率（magcup 内部にビーズが捕獲された割合）をまとめたものである[1]。ビーズの直径が 10 μm であるのに対して、

ビーズ直径より小さい、もしくは同じ大きさの直径 7 μm 、10 μm の magcup を用いて回収実験を行った際にはビーズが全く回収されず、ビーズ直径より magcup 直径が大きくなるにつれて、徐々に回収率が向上するという結果が得られた。すなわち、magcup の内部空間が回収標的に対してサイズフィルタとして機能することが確認された。図 1 (b) に示したとおり、magcup のサイズフィルタ機能は極めて厳密であることが分かる。これは、magcup 作製においてやはりサイズ分布が均一（CV 値 5%以下）なポリスチレン球を鋳型として用いているので、作製された magcup のサイズ分布も同様に均一であるためである。

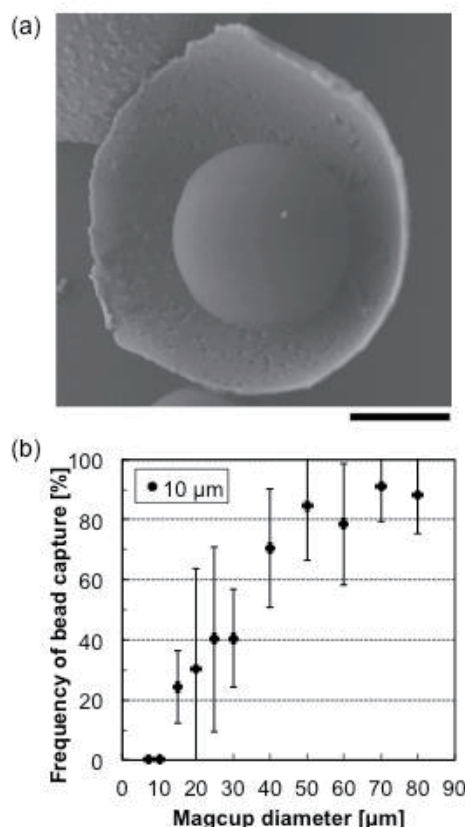


図 1 magcup による直径 10 μm ポリスチレンビーズのサイズ選択的回収結果。(a) 直径 20 μm の magcup によりビーズを回収した例の走査型電子顕微鏡像。Bar, 5 μm 。(b) 直径 7 μm から 80 μm の magcup を用いてビーズを回収した場合の回収率。

図2は直径20 μm から50 μm のmagcupを作製した上で直径10 μm と40 μm (図2a)、20 μm と40 μm (図2b)、30 μm と40 μm (図2c)の、それぞれ2種類のポリスチレンビーズ混合物とmagcupをさらに混合し、各直径のポリスチレンビーズそれぞれに対して回収率(magcup内部にビーズが捕獲された割合)をまとめたものである[1]。はじめに、magcup直径より大きなビーズは全く回収されないという結果が、図1の場合と同様に得られたことから、magcupのサイズフィルタとしての機能が再確認された。次に、両方のビーズが回収される条件の場合(すなわちmagcup直径が50 μm の場合)、magcup直径により近いビーズ(すなわち40 μm ビーズ)がより高頻度に回収されることが明らかになった。この理由についてはさらなる検討が必要であるが、ひとつの可能性として排除体積効果の寄与が考えられる[2]。

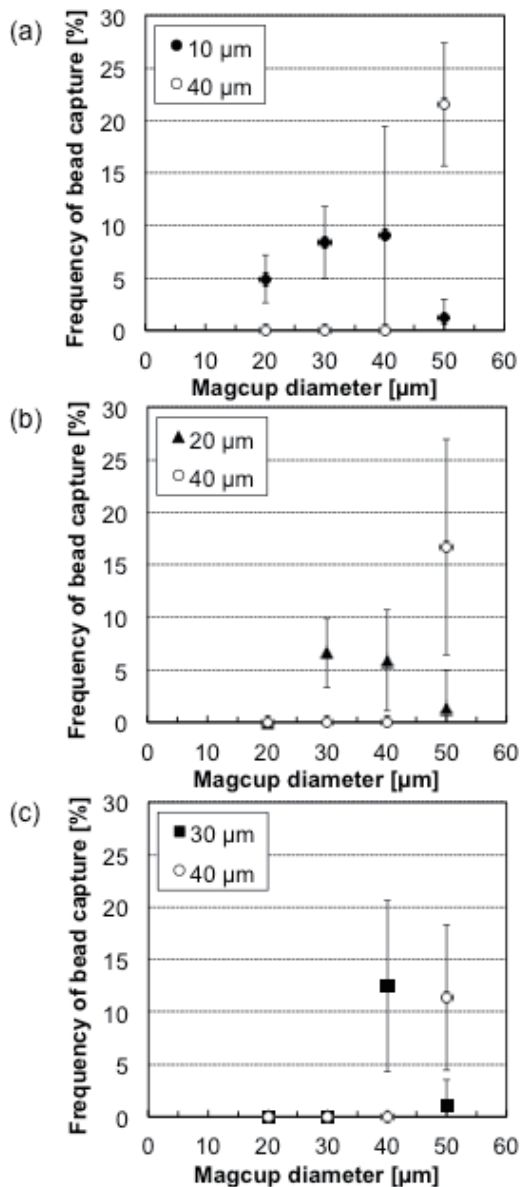


図2 magcupを用いて直径10 μm と40 μm (a)、20 μm と40 μm (b)、30 μm と40 μm (c)の、2種類のポリスチレンビーズ混合物を回収した場合の回収率。

2.2 magcupによる細胞のサイズ選択的回収

ポリスチレンビーズをモデルとして用いた基礎検討結果を踏まえた上で、次にmagcupを用いて細胞をサイズ選択的に回収することが可能であるか評価を行った。培養ヒト血球系細胞(CCRF-CEM、平均直径 $12 \pm 2 \mu\text{m}$)を回収のモデル標的とし、ビーズの場合と同様、まずは直径7 μm から80 μm のmagcupを作製した上で細胞と混合し、各直径magcupの回収率を評価した。図3はそれをまとめた結果である[1]。ビーズの場合と同様、細胞直径より小さい7 μm 、10 μm のmagcupでは細胞が全く回収されず、細胞直径よりmagcup直径が大きくなるにつれて、徐々に回収率が向上するという結果が得られた。すなわち、細胞を回収標的として用いた場合でも、magcupの内部空間がサイズフィルタとして機能することが確認された。

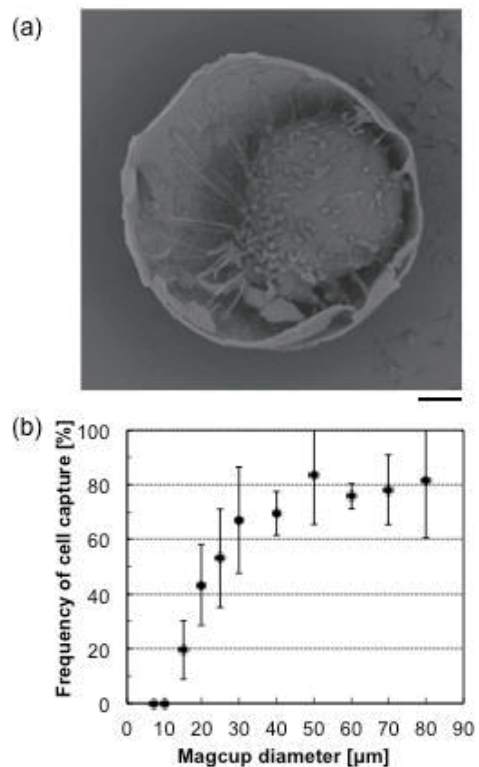


図3 magcupによるCCRF-CEM細胞のサイズ選択的回収結果。(a)直径15 μm のmagcupによりビーズを回収した例の走査型電子顕微鏡像。Bar, 2 μm 。(b)直径7 μm から80 μm のmagcupを用いて細胞を回収した場合の回収率。

Magcupによる細胞回収では、magcup表面を抗体で修飾し細胞を強固に結合させることなどは一切せず、凹面の構造を使って細胞を物理的に回収しているため、回収後も細胞に対するダメージが少ないことが期待される。このことを確かめるために、直径15 μm のmagcupで細胞を回収した後、回収細胞をmagcupに捕獲された状態のまま培養液中に移して経時観察を行いつつ、再培養を行った。図4は、細胞回収直後から10分間隔で経時的に観察を行いつつ、再培養を行った結果である[1]。図4中の細胞はたまたま分裂期に入る直前であったと考えられるが、回収80分後に自発的にmagcupの外に抜け出した後、120分後に分裂す

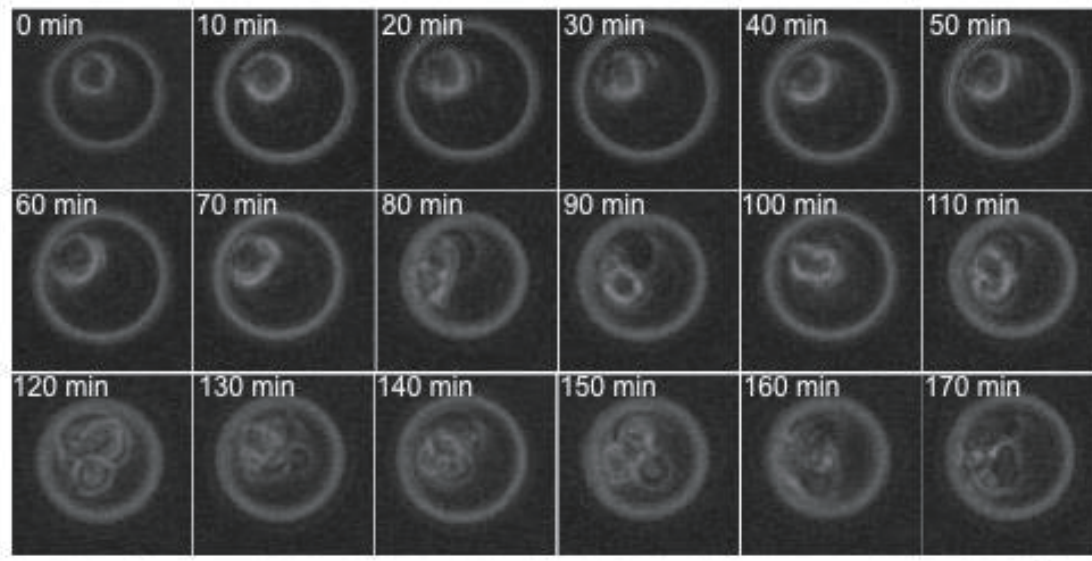


図4 magcup を用いて回収した細胞の再培養結果。30 μm 径のチャンバ（白い円形の外枠）内に magcup と細胞の複合体を閉じ込めた上で、10 分毎に画像を取得しつつ培養を行った。Bar, 20 μm 。

の様子を確認された。この結果から、magcup による細胞回収、および細胞回収後に magcup 共存下で再培養を行うことによる細胞ダメージは無いことが明らかになった。

3. 考察及び今後の展望

本研究では、フィルタ濾過法のサイズ選択性と磁気微粒子精製法の簡便性の両者を兼ね揃えた、新しい細胞精製技術の開発を推進し、その結果、magcup の作製と目的細胞のサイズ選択的回収、さらに回収細胞の再培養に成功した。本技術を用いれば、標的細胞に対して一切の化学処理を行わずインタクトな状態のまま回収を行い、さらに再培養を行うことで細胞数を増やし、その後の解析を円滑に行うことが可能となる。今後の計画としては、様々な種類の細胞が混在した集団の中から目的細胞のみを精度良く回収することが可能であるか、引き続き評価を進める予定である。

本研究は、村上麻希補助員、長沼真衣補助員の多くの研究補助をいただき推進されました。また、本研究は、科学研究費補助金若手研究 (A) のご支援をいただき行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

1. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda, *Sci. Rep.*, 4, 6362 (2014).
2. S. Asakura, F. Oosawa, *J. Chem. Phys.*, 22, 1255 (1954).

業 績

【原著論文】

1. H. Kim, H. Terazono, Y. Nakamura, K. Sakai, A. Hattori, M. Odaka, M. Girault, T. Arao, K. Nishio, Y. Miyagi, K. Yasuda
Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells
PLoS ONE, 9 (8) e104372 (2014)
2. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda
Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres for Size-Selective Cell Filtration
Scientific Reports, 4, 6362 (2014)
3. M. Odaka, H. Kim, M. Girault, A. Hattori, H. Terazono, K. Matsuura, K. Yasuda
Evaluation of Imaging Biomarkers for Identification of Single Cancer Cells in Blood
Japanese Journal of Applied Physics, 54 (6S1), 06FN04 (2015)
4. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda
Depletion Effect on Concave Microstructure Upon Size-Specific Target Particle Collection
Japanese Journal of Applied Physics, in press.

【口頭発表】

1. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda
Development of "Adaptive SEM" Technology for in situ Genome/Proteome Expression Analysis in Single Cell Level
International Microscopy Congress 2014、2014年9月、チェコ
2. 金賢徹、寺藺英之、竹井弘之、安田賢二
超常磁性カップの作製とサイズ選択的細胞回収
第75回応用物理学会学術講演会、2014年9月、札幌
3. H. Kim, H. Terazono, A. Hattori, M. Odaka, M. Girault, K. Yasuda
Imaging biomarkers for identification of target cells: Identification of clustered circulating tumor cells as an example
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月、札幌
4. M. Odaka, M. Girault, H. Kim, A. Hattori, K. Matsuura, H. Terazono, K. Yasuda
Development of the cell imaging biomarker identification algorithm for on-chip multi imaging cell sorter system

5. M. Girault, A. Hattori, H. Kim, K. Matsuura, M. Odaka, H. Terazono, K. Yasuda
Optimization of the single cell encapsulation in the water droplet using 3D microfluidic structure
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月、札幌
6. K. Matsuura, A. Hattori, F. Nomura, H. Terazono, K. Yasuda
Non-firing impedance-based electrophysiological analysis of single cells on micro-electrode arrays
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月、札幌
7. A. Hattori, H. Terazono, K. Matsuura, H. Kim, M. Odaka, M. Girault, K. Yasuda
Investigation of wide range optical set-up for simultaneous real-time analysis of 96-well SBS formatted samples
日本生物物理学会第52回年会、2014年9月、札幌
8. H. Kim, H. Terazono, Y. Nakamura, K. Sakai, A. Hattori, M. Odaka, M. Girault, K. Nishio, Y. Miyagi, K. Yasuda
Development of On-Chip Multi-Imaging Cell Sorter System for Identification of Clustered Circulating Tumor Cells
Advanced Circulating Tumor Cells 2014、2014年10月
9. M. Odaka, H. Kim, M. Girault, A. Hattori, H. Terazono, K. Matsuura, K. Yasuda
Development of the algorithm for recognition and identification of target cells using imaging biomarkers for on-chip multi-imaging cell sorter
MNC2014、2014年11月、福岡
10. M. Girault, A. Hattori, H. Kim, S. Kawada, K. Matsuura, M. Odaka, H. Terazono, K. Yasuda
Studies on size control of pressure-driven micro-droplet formation in microfluidic system
MNC2014、2014年11月、福岡
11. K. Matsuura, H. Terazono, H. Kim, A. Hattori, F. Nomura, K. Yasuda
High-throughput nano-droplet array polymerase chain reaction system with fast and homogeneous temperature control for 24/96/384 sample plate
MNC2014、2014年11月、福岡
12. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda
Size-Specific Target Cell Purification Exploiting Depletion Effect on Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres
MNC2014、2014年11月、福岡

【特 許】

- (1) 国内特許登録 4 件
- (2) 国際特許出願 1 件
- (3) 国内特許出願 3 件

短期集中型実用化プロジェクト

革新的血小板創製技術の確立と
医療応用プロジェクト

革新的血小板創製技術の確立と医療応用プロジェクト

プロジェクトリーダー 松原 由美子

【基本構想】

血小板は体内で止血機能を持つ他類なき細胞である。抗がん剤使用時や出血時などで起こる血小板減少が重篤な場合は死に至る。血小板輸血は、血小板減少に対する唯一の確立された治療であるが、その100%を善意の献血に依存、更に保存期間は僅か4日間であるため、医療現場における需要と供給のアンバランスが問題視されている。この世界的問題を克服すべく、戦略的研究シーズ育成事業（平成25～26年度）では、「輸血用自己血小板の新規安定供給システムの確立」を研究課題名とし、研究代表者が開発した世界初の再生医学/細胞培養技術を基に医療現場において不足が深刻化している輸血用血小板の安定供給システム構築の実現を目的とし、試験管内で少量の皮膚線維芽細胞や脂肪前駆細胞から短期間で大量の血小板を効率良く安定に安全に産生できるシステム開発に向けた研究を遂行した。血小板は、幹細胞から巨核球分化を経て産生される。この体内で起こる細胞分化を試験管内で行い輸血用血小板の大量作製への応用可能な細胞培養システムの最適化を行う為に、戦略的研究シーズ育成事業においては、細胞培養過程の種々のステップの技術開発成果を統合しながら、輸血用血小板としての質（現存する輸血用血小板と同等/同等以上の止血機能を持つ）・量（成人1回分の 2×10^{11} を一括産生）をそなえた実用化レベルのシステム完成度を旨とする研究を行った。その具体的な研究項目として、(1)血小板運命決定因子（血小板誘導因子）の導入の最適化 (2)人工骨髄ニッシェの開発、(3)血小板産生を増多する因子の特定、(4)血小板の機能検討を行った。これまでの成果として、(1)血小板運命決定因子（血小板誘導因子）の導入の最適化：これまでは輸血用血小板の開発として、iPS細胞を経由した血小板作製が報告されていた。我々は、血小板誘導因子 p45NF-E2 を発見したこと(2012 Blood 小野・松原ら)を利用して、iPS細胞を作製せずに皮膚線維芽細胞から直接プログラムミングにより血小板を短期間で作製する技術を開発したことを基盤として、皮膚線維芽細胞や脂肪前駆細胞を用いた p45NF-E2 遺伝子導入の最適化検討を実施した。p45NF-E2 はこれまで血液細胞特異的に発現していると報告されていたが、脂肪前駆細胞にも遺伝子導入前に発現を認めた。また、巨核球分化誘導培地(2013 Methods Mol. Biol. 松原ら)にて培養を行うに従って細胞内 p45NF-E2 の発現増加を示しながら巨核球・血小板分化に至った(2013 PLOS One 松原・小野ら)。したがって、脂肪前駆細胞は、皮膚線維芽細胞と同様に採取負担が軽度で試験管内で増殖力を持ち（通常の研究室のフラスコ培養において3日で3倍）、しかも p45NF-E2 遺伝子を内因性に有しているため、遺伝子導入無しで効率良く血小板分化に至る（特許出願済）。さらに、皮下脂肪前駆細胞集団から巨核球に分化し易い細胞（脂肪前駆細胞由来プレ巨核球前駆細胞：PMP細胞）の同定に成功した。(2)人工骨髄ニッシェの開発：これまでの細胞培養法では、ひとつの巨核球あたり10個の血小板を放出する。この産生効率は、培養環境を骨髄内環境に近づけると10倍以上増加する（既報データ）。本研究において、骨髄内に存在する粘着タンパクであるコラーゲン、フィブリノーゲンを固相したチューブの中に巨核球を流動状態下にて入れて血小板放出効率を検討した。その結果、従来の培養法よりも約10倍の効率で血小板を回収出来た。血小板回収を効率的に行う装置の基盤となる結果を得た。(3)血小板産生を増多する因子の特定：これまでの自験データを基に、脂肪前駆細胞が血小板分化の生体内必須サイトカインであるトロンボポエチンを自ら分泌しながら血小板分化に至るのでは？との仮説を検証した。その結果、脂肪前駆細胞は、血小板分化誘導培地に含まれる生体内因子トランスフェリン 添加刺激によりトロンボポエチンを分泌し、脂肪前駆細胞のトランスフェリン受容体 CD71 やトロンボポエチン受容体 α -MPL の働きを介して、巨核球・血小板分化に至ることを見いだした(4)血小板の機能検討：試験管中で分化誘導を行った脂肪前駆細胞由来の血小板と造血幹細胞由来の血小板、そして末梢血液中血小板の機能検討するために、血流を想定した流動状態下での血小板機能測定装置 T-TAS[®]にて検討を行った。その結果、脂肪前駆細胞由来血小板の機能は、末梢血液中血小板（輸血用血小板のソース）とほぼ同程度、造血幹細胞由来血小板より機能は高いことを認めた。平成26年11月からスタートした短期集中実用化プロジェクトでは、戦略的研究シーズ育成事業の期間で得られた成果に基づき、実用化を目指し、バイオリクターを用いた血小板大量作製の詳細なプロトコルの最適化を行う。得られた作製血小板の止血作用などの機能や安全性試験を *in vitro* と免疫不全マウスを用いた *in vivo* にて行う。さらに複数のバイオリクター導入に向けたシステムの最適化や機能保持に適した保存システムを確立する。

1. 平成 26 年度の研究目的

プロジェクト 1 年目となる 26 年度は、戦略的研究シーズ育成事業（平成 25～26 年度）、「輸血用自己血小板の新規安定供給システムの確立」にて得られた再生医学技術を基盤として、本研究では主にヒト皮下脂肪前駆細胞に由来する株化細胞を巨核球・血小板作製のソースとして分化誘導を行い、輸血用血小板としての質（現存する輸血用血小板と同等／同等以上の止血機能を持つ）・量（成人 1 回分の 2×10^{11} を一括産生）をそなえた実用化レベルのシステム完成度をめざす。また、同様の血小板作製技術を用いて得られた細胞を創傷治療への応用に展開したい。

細胞由来血小板を医療応用に向けて作製する際の重要ポイントは、(1) 安全性、(2) 血小板作製量、(3) 血小板機能、そして(4) コスト、である。現在、輸血用血小板を作製する試みは、iPS 細胞を用いるアプローチが論文報告されており、本研究の競合技術と考えられる。それぞれ細胞を用いた場合の上記ポイントについて比較すると、(1) 安全性と(2) 血小板作製量：「脂肪前駆細胞」も「iPS 細胞から作製した巨核球」も大量の血小板安定供給の鍵である「細胞増殖能と血小板への分化能力を半永久的に獲得した細胞株」の樹立に成功しており、作製量に関しては同等と考えられるが、脂肪前駆細胞は正常細胞でありながら遺伝子導入を一切行わず（巨核球・血小板分化の決定転写因子を脂肪前駆細胞は有しているため）に株化に成功しているに比し、iPS 細胞においては iPS 細胞作製にがん関連因子を含む 4 因子の遺伝子導入に加え、さらに巨核球株を作製する際にがん関連因子を含む 2 因子の遺伝子導入が必要である。したがって、安全性においては脂肪前駆細胞が優位性を有する。(3) 血小板機能：脂肪前駆細胞から作製された血小板は造血幹細胞から作製された血小板よりも有意に血栓形成機能が高い。これは、脂肪前駆細胞が有する細胞内物質の働きが考えられている。また、血小板機能発現に必須である血小板内顆粒形成が脂肪前駆細胞由来血小板では豊富に認められるが、iPS 細胞由来血小板では乏しいことがそれぞれ論文報告されている。(4) コスト：脂肪前駆細胞からの血小板作製法は非常にシンプルで生体内物質であるトランスフェリン添加により行われる。その添加刺激で巨核球・血小板分化に必須のサイトカインであるトロンボポエチンを自ら分泌しながら分化に至る。一方、iPS 細胞使用では、feeder 細胞との共培養の必要性や遺伝子操作のための手技、さらには遺伝子組換えトロンボポエチン添加が必要であり、同等の脂肪前駆細胞使用に比し、我々の研究室での検討では、約 20 倍のコスト増である。これら個々の点において脂肪前駆細胞の使用は優位性が高いと考えられる。

平成 26 年度 4 月から行う具体的な重点項目は、作製血小板のプロトコル最適化（内容・方法：脂肪前駆細胞を用いて、遺伝子導入や組換えサイトカインの添加を必

要としない血小板作製技術の確立）である。

平成 26 年度 11 月から 3 月に行う具体的な重点項目は、作製血小板のプロトコル最適化（内容・方法：バイオリアクター用いた血小板の大量作製技術の確立）である。

また、作製血小板の機能評価として、in vitro での作製血小板の機能評価系の確立（内容・方法：in vitro において顆粒放出能、血小板凝集能、血栓形成能）である。

2. 平成 26 年度の研究成果

本研究は戦略シーズンにて得られた成果「皮下脂肪前駆細胞が血小板に分化する分子メカニズム」を活用して、少量の皮下脂肪前駆細胞から血小板を安全・安定に大量作製するためのシステム構築を目指すプロトコル作成を行う。脂肪前駆細胞からの血小板作製過程は、(1) 脂肪前駆細胞 → (2) 血小板の親細胞である巨核球への分化 → (3) 血小板産生に大別される。戦略シーズンにおいては、作製血小板のソースとして脂肪前駆細胞が適している細胞であることを見いだした。その科学的根拠として、脂肪前駆細胞は、巨核球への分化決定に重要な転写因子やサイトカインを有していることを明らかにした。平成 26 年 11 月からの 5 ヶ月間に、(1) の血小板に分化しやすい CD71 陽性脂肪前駆細胞の同定や、細胞の増殖能や分化能を維持するための株化プロトコルの確立を行った。これら細胞を用いて血小板を作製すべく、(2) や(3) を行う細胞培養のバイオリアクターの設置をはじめとする研究室の設立を行った。また、作製血小板の機能評価法の検討として、フローサイトメトリーを用いて、血小板機能発現の要となる膜受容体の機能を定量評価する方法のプロトコル作成を行った。さらにシングルセル解析を行い分化誘導効率の増加につながる因子の検出を行った。本プロジェクトに集中できる研究機器を装備した研究室の設置により研究が加速された。研究は計画に従い順調に進んでいる。

前述のように、プロジェクトに集中できる研究機器を装備した研究室の設置により研究が加速された。自室で行う検討項目（作製血小板のプロトコル最適化や in vitro での作製血小板の機能評価）に関しては計画どおり順調に進んでいる。変更の可能性のある点は、in vitro での作製血小板の機能評価の方法である。予定していた本研究チームにおける従来法での検討から、別の方法での検討に着手している。巨核球・血小板作製の細胞ソースとなる脂肪前駆細胞に関する重要な成果が得られた。多くの細胞が混在する皮下脂肪組織から血小板に分化しやすい細胞の同定に成功した。さらに、これら細胞の血小板への分化誘導効率を上げるための細胞の前処理法を見いだした。また脂肪前駆細胞の分化能と増殖能を維持するための株化プロトコルが確立できた。現在行っている血小板機能評価は、手技が煩雑のため、簡易な方法での評価技術確立を急ぎたい。作製血小板のプロトコル最適化（バイオリアクター用い

た血小板の大量作製技術の確立)を平成27年度末から平成28年度中期までに行う。作製血小板の機能評価法の確立として、in vitroでの作製血小板の機能評価(in vitroにおいて顆粒放出能、血小板凝集能、血栓形成能)は平成27年度末までにプロトコール作成を行う。作製血小板の機能評価・安全性試験として、創傷NOG(免疫不全)マウスを用いての輸血効果を検討するプロトコール作成は、平成28年度末までに行う。ヒト作製血小板の創傷治癒効果を

検討するためのプロトコール作成は平成27年度末までを目指す。作製血小板の医療応用に向けた大量培養法の確立・機能保持に適した保存技術のプロトコール確立は平成29年度半ばまでに完成を目指す。

脂肪前駆細胞を用いて、遺伝子導入や組換えサイトカインの 添加を必要としない血小板作製技術・評価法の確立

宇留賀 友佳子

1. はじめに

血小板は体内で止血機能を持つ他類なき細胞である。抗がん剤使用時や出血時などで起こる血小板減少が重篤な場合は死に至る。血小板輸血は、血小板減少に対する唯一の確立された治療であるが、その100%を善意の献血に依存、更に保存期間は僅か4日間であるため、医療現場における需要と供給のアンバランスが問題視されている。この世界的問題を克服すべく、戦略的研究シーズ育成事業（平成25～26年度）では、「輸血用自己血小板の新規安定供給システムの確立」を研究課題名とし、研究代表者が開発した世界初の再生医学/細胞培養技術を基に医療現場において不足が深刻化している輸血用血小板の安定供給システム構築の実現を目的とし、試験管内で少量の皮膚線維芽細胞や脂肪前駆細胞から短時間で大量の血小板を効率良く安定に安全に産生できるシステム開発に向けた研究を遂行した。血小板は、幹細胞から巨核球分化を経て産生される。この体内で起こる細胞分化を試験管内で行い輸血用血小板の大量作製への応用可能な細胞培養システムの最適化を行う為に、戦略的研究シーズ育成事業においては、細胞培養過程の種々のステップの技術開発成果を統合しながら、輸血用血小板としての質（現存する輸血用血小板と同等/同等以上の止血機能を持つ）・量（成人1回分の 2×10^{11} を一括産生）をそなえた実用化レベルのシステム完成度を目指す研究を行った。

1. 実験と結果

脂肪前駆細胞は血液細胞とは分化系統が明らかに異なる細胞である。はじめに、ヒト脂肪前駆細胞の表面抗原マーカー解析を行った。発現プロファイルとしては、CD34(-)/CD41(-)/CD45(-)/CD31(-)/CD14(-)/CD116(-)/CD235(-)/CD56(-)/CD29(+)/CD13(+)/CD73(+)/CD90(+)/CD44(+)
(+)と血液細胞のマーカー発現は認められず、間葉系細胞のマーカー発現が認められた。脂肪前駆細胞はトリプシン処理後、巨核球分化誘導培地を用いて培養を行うと巨核球分化・血小板産生に至る。ここで用いる巨核球分化誘導培地は、造血幹細胞から血小板分化誘導を行う培地と同じものである。脂肪前駆細胞からの血小板産生のために、特別な試薬や遺伝子導入を必要とせず、なぜ間葉系細胞である脂肪前駆細胞から血小板が産生されるのか?の機序解明研究に着手した。血液細胞の分化は、転写因子とサイトカインの制御を高度に受けている事に着目し、まずは転写因

子の遺伝子発現解析を定量リアルタイムPCR法を用いて行った。その結果、巨核球・血小板分化に重要とされているFOG、Flt1、GATA2、RUNX1、p45NF-E2の発現が認められた。OCTやSOX2といった多能性に関する因子の発現は認められなかった。これらの中で特にp45NF-E2は、巨核球分化誘導の過程で、その発現量の増加が認められた為、脂肪前駆細胞からの血小板分化におけるp45NF-E2の役割の検討目的で、p45NF-E2遺伝子強制発現させた脂肪前駆細胞からの巨核球分化・血小板産生の解析を行った。その結果、巨核球・血小板産生の数が増加したことを認めた。以前、海外のグループで造血幹細胞にp45NF-E2遺伝子を強制発現させ、脂肪前駆細胞同様に巨核球・血小板産生の数が増加したことを報告している。また一方で、我々はp45NF-E2とその結合因子Mafを遺伝子導入したヒト皮膚線維芽細胞が巨核球に分化し、血小板を産生することを見いだした。ヒト皮膚線維芽細胞を巨核球分化誘導培地で培養しても巨核球に分化しないことから、p45NF-E2/Mafが巨核球分化制御に重要な転写因子であることを示している。Mafはユビキタスに発現している因子である。したがって、脂肪前駆細胞は巨核球分化制御に重要な転写因子p45NF-E2を有していることが、その血小板産生機構の機序のひとつと考えられる。すなわち、脂肪前駆細胞は既にp45NF-E2を有しているため、遺伝子改変を必要とせず、造血幹細胞からの巨核球・血小板分化培地と同じ培地を用いて巨核球分化・血小板産生に至ると考えられる。

TPOは巨核球分化・血小板産生に重要なサイトカインである。その重要性を示す知見として、TPOノックアウトマウスの血小板数は野生型の10分の1である。また、造血幹細胞や多能性幹細胞、あるいはp45NF-E2/Maf遺伝子導入皮膚線維芽細胞から巨核球や血小板分化を行う際には、組換えTPO(rTPO)の添加が必須である。TPOの受容体であるMPLに対する作動薬は、血小板増多薬として開発され、臨床に使用されている。これら事実からもTPOの巨核球分化・血小板産生における重要性が示されている。TPOの主な産生は肝臓であることが知られている。しかしながら、我々は脂肪前駆細胞の定量リアルタイムPCR法による遺伝子解析において、TPOとMPLの遺伝子を発現していることを認めた。TPO遺伝子の塩基配列をシーケンスにより検討した結果、既報の配列と一致していた。次にTPOタンパクの発現検討を試みた。脂肪前駆細胞からrTPO非添加

下条件における巨核球分化・血小板産生の過程のそれぞれでの培養上清中のTPO濃度の測定をELISA法を用いて行った。その結果、脂肪前駆細胞を維持用培地を用いて培養した培養上清におけるTPO発現(細胞からのTPO分泌)は認められなかったが、脂肪前駆細胞をトリプシン処理後にrTPO非添加巨核球分化誘導培地にて培養した培養上清におけるTPO発現を認めた。そこで、脂肪前駆細胞をrTPO存在下・非存在下(+/-)の条件で巨核球・血小板への分化誘導を行ったところ、特異的表面マーカーであるCD41やCD42bの発現細胞数、DNA ploidyにrTPO(+/-)の差は認められなかった。また、脂肪前駆細胞をトリプシン処理後、rTPO非添加巨核球分化誘導培地にMPL機能阻害作用を有する抗MPL抗体の添加条件にて培養を行った結果、MPL濃度依存性に巨核球産生抑制が認められた。これら結果は、(1)脂肪前駆細胞は巨核球分化誘導培地で培養する際にTPOを分泌、(2)脂肪前駆細胞が巨核球分化誘導培地に分泌するTPOは、細胞を巨核球分化に誘導する活性を有している、(3)脂肪前駆細胞からの巨核球分化・血小板産生は、脂肪前駆細胞が分泌するTPOとMPLの作用が重要な役割を有する。この知見の分子機序の解明研究において、分化誘導培地に含まれ生体内物質でもあるトランスフェリンがその受容体であるCD71を介してTPO分泌刺激に至ることを認めた。そこでCD71(+)脂肪前駆細胞が巨核球に分化し易い細胞であるという仮説を考え、ヒト脂肪前駆細胞をCD71(+/-)細胞にFACSにて単離、巨核球分化誘導培地にて

6日間培養を行った。培養上清中のTPOレベルは巨核球分化誘導前細胞では認めず、誘導後はCD71(+)細胞 31 ± 16 pg/mLに比しCD71(-)細胞 7 ± 3 pg/mLであった($p=0.014$)。それぞれの細胞群(4×10^5 個)からの巨核球(CD41陽性大型細胞)数の定量解析結果は、CD71(+)細胞からは $6,20 \pm 0.84 \times 10^4$ 巨核球、CD71(-)細胞からは $1,10 \pm 0.14 \times 10^4$ 巨核球であった($p=0.013$)。本知見は、CD71(+)PADのFACS単離は、その細胞のTPO分泌の機序を介して巨核球産生効率アップシステム構築につながることを示した。

in vitroでの作製血小板の機能評価は、予定していた本研究チームにおける従来法での検討から、別の方法での検討に着手している。作製血小板に特異的惹起剤を作用させ、血小板のリガンドに標識したものととの反応をフローサイトメーターを用いて検出する。この方法は作製血小板の機能を定量的に解析できるため、今後における有力な評価法のひとつと考える。

シングルセルでの遺伝子発現解析に向けた検討

瀧澤 典子

1. はじめに

本研究では、脂肪前駆細胞から血小板を作製する技術の確立を行う。その効率を上げるためには科学的根拠に基づいた培養技術の開発が必要である。今回、脂肪前駆細胞の中でどのような遺伝子発現を呈する細胞が巨核球に分化し易いかを検討するため、シングルセル解析に着手した。均一な細胞集団は存在しないことから、細胞集団を対象としたマイクロアレイ解析では多くの混在物が結果に影響していることが問題視されている。近年では、ひとつの細胞ごとに遺伝子発現解析を行うシングルセル解析が行われている。平成26年11月からスタートした本プロジェクトにおいて、脂肪前駆細胞、脂肪前駆細胞株および造血幹細胞とそれぞれの細胞を巨核球分化誘導培地にて培養した細胞を対象にシングルセル解析に向けた検討を行っている。

これら細胞は、Fluidigm C1 Single-Cell Auto Prep Systemを用いてシングルセルを調製した。上記それぞれの細胞群において、50%から80%の細胞のシングルセル化に成功し、それぞれシングルセル由来のcDNAを得た。cDNAは、上記キットの試薬を用いて増幅を行った。その結果、約5000倍のcDNA増幅に成功した。今後は、これらサンプルを用いたシングルセルにおける候補因子解析やマイクロアレイ解析を行う。

1. 実験と結果

解析の対象と実験条件を下記の表に示す。

細胞名称	維持培養	維持培養時使用培地	フラスコの向き	融解時播種密度
hCD34+細胞	不可	—	—	—
DFAT細胞	可	Basal Medium	横置き(接着細胞)	
Human Pre-adipocyte	可	Basal Medium	横置き(接着細胞)	

Day 0サンプル

細胞名称	細胞融解時使用培地	誘導培地
hCD34+細胞	SF培地 + TPO(100ng/mL)	SF培地 + TPO(100ng/mL) (用事調製)
DFAT細胞	Basal Medium	SF培地
Human Pre-adipocyte	Basal Medium	SF培地

細胞名称	Day3培養時使用培地	培養条件	細胞の状態	フラスコの向き
hCD34+細胞	SF培地 + TPO(100ng/mL)	37°C、5% CO2濃度、20×10000 cells/mL	浮遊	縦置き
DFAT細胞	SF培地		浮遊 ※1	縦置き
Human Pre-adipocyte	SF培地		浮遊 ※1	縦置き

業 績

【原著論文】

1. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Matsubara Y. Megakaryopoiesis. Clinical and experimental thrombosis and hemostasis. Clin Exp Thromb Hemost,1(2)54-58, (2014)
2. Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, Matsubara Y, Ohnishi T, Hosokawa K, Murata M. Studies of a microchip flow-chamber system to characterize whole blood thrombogenicity in healthy individuals. Thromb Res. 132 (2): 263-270, (2013)
3. Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. OP9 bone marrow stromal cells differentiate into megakaryocytes and platelets. Plos One 8 (3): e58123, (2013)

【総説】

1. 松原由美子：脂肪前駆細胞からの血小板作製
Thrombosis Medicine 5 (2) 22-27 (2015)
2. 松原由美子：マウスおよびヒト線維芽細胞から血小板への直接リプログラミング 細胞 46 (5) 8-11, (2014)
3. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球へのダイレクトリプログラミング (Generation of Megakaryocytes from fibroblasts and preadipocytes) 臨床血液 55 (4) 387-395 (2014)
4. 小野—宇留賀友佳子、松原由美子：線維芽細胞→巨核球・血小板 (実験工学 別冊)ダイレクトリプログラミング 22-30 (2015)
5. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球・血小板への direct conversion Annual Review 2014 血液 181-185, (2014)

【書籍】

1. 松原由美子：血小板産生のメカニズム (新・血栓止血血管学) 金芳堂 2015
2. 松原由美子：血栓形成における血小板の役割
ファーマコナビゲーターシリーズ 抗凝固療法編
メディカルビュー社 2014
3. 松原由美子、村田満：血小板と止血 血栓・止血ハンドブック 西村書店 2014

【口頭発表】

1. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Toshio Suda, Yumiko Matsubara: Identification of Megakaryocytic Progenitor Cells among Subcutaneous Pre-adipocytes Thrombopoietin. XXV The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2015年6月 トロント
2. 戸澤 圭一、小野—宇留賀 友佳子、堀内 正、村田 満、岡本 真一郎、池田 康夫、須田 年生、松原 由美子: ヒト脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導システム:トランスフェリン/CD71/TPO 分泌機序を介した高効率産生 第37回日本血栓止血学会 2015年5月 甲府
3. Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Sahoko Matsuoka, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Toshio Suda, Yumiko Matsubara: A Novel Mechanism of Megakaryopoiesis from Pre-adipocytes: Involvement of Transferrin/ CD71/ TPO Pathways. 56rd The American Society of Hematology. 2014年12月サンフランシスコ
4. Yukako Ono-Uruga, Sahoko Matsuoka, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Toshio Suda, and Yumiko Matsubara. Megakaryocyte Differentiation from Preadipocytes through the Production of Endogenous Thrombopoietin via CD71 第76回 日本血液学会 2014年10月大阪
5. Yumiko Matsubara: A Novel Mechanism of Megakaryopoiesis from Pre-adipocytes: Involvement of Transferrin/CD71/TPO Pathways The 9th Aso International Meeting 2015年5月阿蘇
6. 松原由美子：脂肪幹細胞 (脂肪前駆細胞) 由来の巨核球・血小板 (教育講演) 第63回 日本輸血・細胞治療学会総会 2015年5月 東京

【特許】

- (1)国内特許出願 3件
- (2)国外特許出願 1件