

脳の機能を支える血管周囲の病理を制御する ーナノ粒子と機械学習を活用したアプローチへー

東京理科大学 先進工学部 機能デザイン工学科 准教授 うめざわ まさかず
梅澤 雅和

■「脳」と「血管」というと、何が思い浮かびますか？

私たちの体の中で血管は、酸素や栄養を体のすみずみまで送り、逆に二酸化炭素や老廃物を回収する血液の流れる場です。その重要な構造は、私たちの活動や生命機能を司る脳組織の中にも走っています。脳は特に、感知した入力情報を処理・統合し、運動⁽¹⁾のアウトプットを出力するために膨大な細胞活動が中で起こっており、大量のエネルギーを要する組織です。そのために、エネルギーに速く変換できる栄養素の分子であるグルコース⁽²⁾を多量に取り込むことが知られています。実際に、脳はこの分子に対するトランスポーターという輸送体⁽³⁾を介して、グルコースを積極的に血液から取り込む機構を持っています。もちろん、グルコースから多量のエネルギーを取り出すための酸素も脳は多く必要とします。脳の血管が詰まる疾患に「脳梗塞」がありますが、これが起こって酸素が送られなくなると、その先の領域は短時間で損傷してしまいます。このことから、脳が血液から供給される酸素や栄養素を常に必要にしていることがお分かりいただけるでしょう。

「脳」と「血管」の2つの語が連なる「血液脳関門」という言葉を聞いたことのある人も多いかもしれません。この「関門」は脳にとって重要なバリアとして機能しています。脳は、グルコースのように必要な栄養素である分子を取り込む必要があると同時に、その複雑な機能を外界から守るために、血液中にある外来分子（異物）の脳内への侵入を防ぐ必要があります。そのために、脳組織の中を走行する毛細血管の内壁を成す血管内皮細胞は、他の場所にある毛細血管よりも細胞どうしの接着が強固⁽⁴⁾になっています。これによって、血管内皮の細胞と細胞の間の隙間を通した血管から脳への物質の輸送が強く制限されているのです。

(*1: この「運動」はスポーツのことではなく、生物の動きそのものを指します。)

(*2: 単糖の一種で、これが長く連なったでんぶんの加水分解により生じます。)

(*3: グルコースに特異的な輸送体は、グルコーストランスポーター (glucose transporter: GLUT) と呼ばれます。脳の他に、栄養吸収の場である小腸などにも存在しますが、特に脳に多く存在するものは1型であり GLUT1 と呼ばれます。GLUT は PET (陽電子放射断層撮影法) の標的にすることで、生体内部の場所によるエネルギー消費の濃度を可視化できることでも有名です。)

(*4: この細胞どうしの強固な接着は、密着結合 (tight junction) と呼ばれます。)

■ 脳の血管周囲には何があるのか？

それでは、この血液脳関門を構成する周囲の領域には何があるのでしょうか？ 脳は神経細胞の活動がその主な機能を担っていますが、そもそも脳を構成しているのは、神経細胞だけではありません。実はなんと、脳を構成する細胞の9割はグリア細胞という、神経以外の細胞であると分かっています。グリア (glia) の語源は「膠 (にかわ)」。この神経以外の細胞が、発見された当初は神経細胞の間を埋めるだけの存在にすぎず、大した機能を持っているとは考えられていませんでした。しかし研究の進展により、このグリア細胞が単なる神経回路の支持役でなく、脳の精巧な情報処理に必須の要素であることが分かっています。

脳の血管周囲では、グリア細胞のうち星状膠細胞 (astrocyte, 以下アストロサイトと表記します) が多く存在しています。「アストロ」はギリシャ語の astron (星) に由来し、英語でも「星の」を意味する接頭辞。アストロサイトが多数の突起を四方八方に伸ばした複雑な形を持ち、輝く星のような姿であることからこの名で呼ばれます。アストロサイトは、神経細胞どうしの接続部であるシナプスや脳血管を覆っており、様々な分子を出すことでこれらの機能を調節しています。血管周囲には他に、血管内皮細胞の一つ奥の位置に周皮細胞 (ペリサイト) もあります。これら血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトの共培養系として血液脳関門の特性を保持したものは、細胞の性質やそこへの薬物の効果などの検討をできる「血液脳関門 in vitro 再構成モデル」として市販されています。この

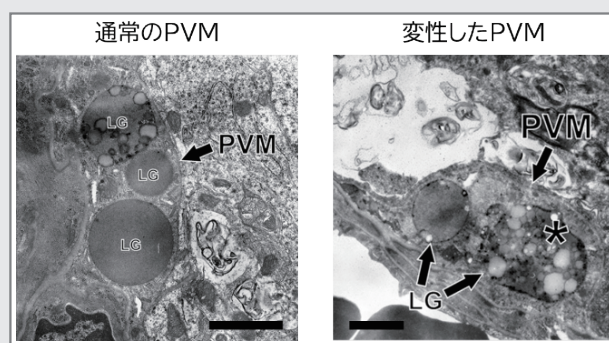
ことから、脳の機能やその健康・疾病を考える上で、脳の血管周囲の構造と機能を理解することの重要性がお分かりいただけるでしょう。これらに加えて、脳の血管周囲には脳血管周囲マクロファージ (perivascular macrophages: 以下 PVMs と表記します) が存在します。PVMs は上記の 3 種の細胞よりも数としては多くないものの脳の血管周囲に常在し、異物、病原性物質、異常構造タンパク質などを脳内から血管側に排出する役割を担っていることが分かっています。

■ 大気汚染が発達期の脳に影響する？

私たちはこの脳の血管周囲に注目すべき病理をもたらす要因として、以前から大気汚染に注目していました。大気汚染には様々なものが含まれますが、大気中を浮遊する PM2.5 と呼ばれる「小さな粒子」のうち特に超微小なナノ粒子がもたらす特異な作用を、武田健先生（東京理科大学名誉教授、元薬学部長、元副学長）の統括する研究グループで見出していました¹⁾。その中で特に、現代でも無視できない濃度の炭素（カーボンブラック）を主とするナノ粒子の胎児期曝露に対して、①発達期の脳が感受性高く影響を受けること、②その影響の少なくとも一部は出生後長い期間にわたって持続することが、実験動物を観察する薬理・病理学的研究により明らかになったのです²⁾。この研究が進むのと同時期に、妊娠期の大気環境と出生児の脳神経系疾患の発症率との関連を示した疫学研究も、他国から複数報告されました。

大気汚染は日本にいとすでに“解決した問題”に見えるかもしれませんが、実際に、20 世紀後半に公害として問題になった汚染も一つ一つ改善が進み、1990 年代にも聞こえた都心の光化学スモッグ注意報も今は聞かれなくなりました。しかし、様々な環境要因の中で大気汚染は、現在も人の健康に影響を及ぼす重要な高リスク要因であることが国際的な共通認識であり³⁾、最近でも新型コロナウイルス感染症に伴うロックダウンによる世界の大気汚染の一時的な変化が調査・報告されるなど関心が持たれています⁴⁾。これは途上国や新興国に限らない問題であり、先進国においても大都市など、交通が集中するところを中心にリスクが局在している可能性も指摘されています。

それでは、大気汚染モデルのナノ粒子の胎児期曝露は発達期の脳にどのような影響を及ぼすのでしょうか？ 大気汚染が免疫系やアレルギー疾患に影響する可能性はよく知られていた一方で、脳への影響は複雑



【図 1】カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により出生児マウス（6 週齢）の脳血管周囲マクロファージ（PVM）で観察される微小形態の異常

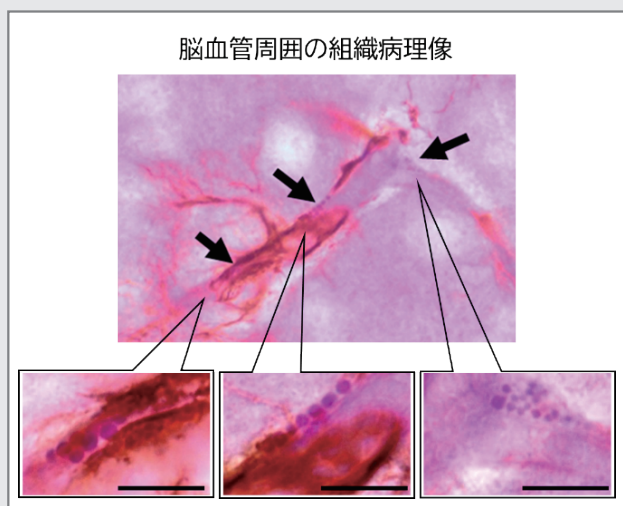
LG: PVM の消化顆粒, *: LG の変性像（蜂の巣状構造）を示す。画像中の黒線は、各画像中での $2 \mu\text{m}$ の長さを示している。画像は、栃木臨床病理研究所の故・菅又昌雄所長が行った観察結果として、Onoda⁵⁾ の図を一部抜粋した。電子顕微鏡で一回に観察できる生体組織の体積は、多く見積もっても 0.1 mm^3 程度に過ぎない。これを踏まえても、脳内のどこを見ても存在するわけではない PVMs を捉えたこの像は貴重な知見である。なお、曝露群では PVMs の数自体が減少もしており⁶⁾、電子顕微鏡でこの細胞を探し、その像を捉えること自体が容易でない試みであった。

なテーマであり、容易には見えないのも事実です。しかし、容易に見えないからこそ重要なテーマであると言えるのではないのでしょうか。次に、その詳細に迫っていきしたいと思います。

■ 脳血管周囲マクロファージの変性と連動して生じるアストロサイトの活性化

脳を含む生体組織では、物質の代謝や機能調節など様々な役割を担うタンパク質の素になる遺伝子の発現が常に起こっています。この遺伝子発現の全体像を捉えることで、大気汚染モデルのナノ粒子が発達期の脳に及ぼす影響の傾向が様々に明らかになりました⁵⁾。一方で、このときに細胞の形態レベルでどのような変化が起こっているのかを明らかにすることは容易でありませんでした。その極めて難しい課題に小野田淳人さん（2017 年度東京理科大学博士課程修了、現・山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部）が挑戦しました。その結果として初めに観察されたのは、先に紹介した PVMs に生じる奇妙な変化でした【図 1】。

通常の PVM では、異物を分解する場であるリソソーム顆粒 (lysosomal granule: LG) が、電子顕微鏡観察下で均質な像で観察されます【図 1 左】。一方で、カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露群ではリソソーム顆粒が泡沫化し、蜂の巣状構造となった PVMs の変性像が観察されます【図 1 右】。これほどに細胞内の微細構造に変化が生じると細胞の機能が正常に保



【図2】カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により出生児マウス（6週齢）のPVMおよび隣り合うアストロサイトに生じる変化（図中の黒線は10 μ mを表す。Onodaら⁶⁾の図を一部抜粋、東京理科大学 武田健研究グループの二本木夫先生のご協力の下で得られた観察結果である。）

たれているとは考えにくく、重要な変化が周囲で起きているであろうと考えられました。それでは、この変性PVMsの隣では何が起きているのでしょうか？それを示したのが【図2】です。

【図1】で電子顕微鏡像を示したPVMsの顆粒は、光学顕微鏡下ではPAS染色という特殊染色法により濃いピンク色に観察されます。一方で、種々の細胞が発現しているタンパク質の種類や量の顕微鏡下での観察には、ターゲットのタンパク質に特異的な抗体を用いた免疫組織化学法（免疫染色法）が有効です。そこで小野田さんは、一つの病理観察用の組織切片を抗体で処理した後にPAS染色をするPAS-免疫組織化学二重染色法を脳の観察に初めて応用し⁷⁾、脳血管周囲の細胞の形態として新奇かつ美しい像を観察しました【図2】。

この画像では、PVMsの消化顆粒が濃ピンク色で、茶色ではアストロサイトの突起の伸長に関わるGFAP⁽⁵⁾というタンパク質が可視化されています。【図2】の上図では、やや白く抜けてみえる脳の毛細血管の周囲に、PVMの消化顆粒（濃ピンク色）とアストロサイトの突起で発現するGFAP（茶色）が観察されます。ここでは、一つの脳血管周囲のPVMには、直径1.5 μ m以下と比較的小さい消化顆粒を持つもの（【図2】上の右の矢印）と、直径1.5 μ m以上に肥大した消化顆粒（変性しており、強く染色されてもいる）を持つもの（【図2】上の左および中の矢印）の両方が存在していることが分かります。【図2】の下に示しているのは、各PVMの周囲の拡大像です。これを見る

と、消化顆粒が肥大化し変性しつつあるPVMsに接触するアストロサイトの突起ではGFAPが強く発現する一方で、消化顆粒の変性のないPVMsの隣にはこのGFAPの発現がないことが分かります。つまり、一つの脳血管周囲においてもアストロサイトの活性化が、変性したPVMsに直接接触する箇所でのみ起こっていたのです。

注目すべきことは、これがカーボンブラックナノ粒子の曝露のあった時期（胎児期）の脳でなく、その曝露を受けた児（マウス）の出生後1.5ヵ月以上（発達段階としては、ヒトでの数年以上に相当します）経過した後にもまで持続的に観察される所見であることです。このことは、初めに観察したPVMsの変性【図1】が環境に対するマクロファージの単なる短期的応答でなく、脳の血管周囲に生じる何かしら重要で持続的な変化の存在を示唆するものでした。加えて、この所見の強さが胎児期におけるカーボンブラックナノ粒子の曝露量によく相関しており⁸⁾、経気道的に異なる曝露方法によっても再現良く観察されるものでもありました⁹⁾。そこで私たちは、脳内のこの微細な領域で起きている現象の詳細をさらに追究することを目指しました。

（*5：GFAP＝グリア線維性酸性タンパク質。アストロサイトの突起の形成・伸長に関与する細胞骨格を構成し、アストロサイトが強く活性化した際に増加するタンパク質です。）

■ 脳の血管周囲に異常構造タンパク質が蓄積する所見と、疾患や加齢との関わり

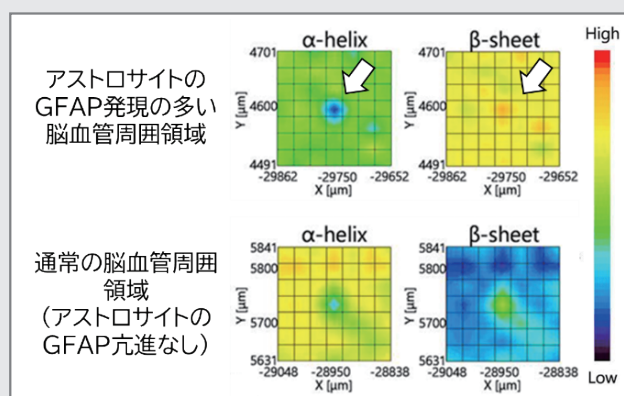
カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により、出生児マウスの脳に生じる持続的なPVMの変性とアストロサイトの活性化の周囲で何が起ころのでしょうか。結論から言いますとタンパク質の β シート構造という、いわゆる老廃物や疾患の原因タンパク質に多くタンパク質の分解性を下げるような構造がそこでは増加します。この検討のためには、赤外光を用いた分光スペクトルイメージングによる脳組織切片の観察が新たな知見をもたらしました。

この検討は、赤外分光の研究に実績のある川崎平康先生（現・高エネルギー加速器研究機構）のご協力を仰いで行いました。川崎先生は、タンパク質の特定の構造でのみ吸収される波数⁽⁶⁾のパルス赤外光を凝集性のタンパク質（アミロイド β ）に照射することで、その凝集の原因となる構造のみの破壊によるアミロイド β の分解性向上などの研究成果を挙げられていました。アミノ酸が直列に長く連なるタンパク質は、その分子

自体が α ヘリックス（らせん）や β シート（折り畳み）といった二次構造（立体構造）をとります。同じタンパク質分子であっても、二次構造が変わることで分子内の原子間結合の振動が変わるために、赤外域での吸収スペクトルが変わります。これを逆に利用するとタンパク質を含む試料の赤外域での吸収スペクトルを測定することで、観察対象に含まれるタンパク質の二次構造の増減を明らかにできるのです。この観察では、赤外分光イメージングに供する脳組織切片の連続切片を先の免疫組織化学により分析しました。これによって、脳の血管周囲領域の赤外スペクトルのデータを、アストロサイトの GFAP 発現の多い領域とそうでない領域に分けて比較しました。その結果、アストロサイトの GFAP 発現の多い領域でのみ脳血管周囲のタンパク質 α ヘリックスの割合が低下し、逆にそこで β シートの割合が増加していることが分かりました¹⁰⁾

【図 3】 その後の検討により、この領域では β シート構造の多いタンパク質が単に増加するだけでなく小胞体ストレスの亢進が認められ、この β シート構造の増加は異常構造タンパク質の蓄積として生じていたと考えられます¹¹⁾。加えて、このような脳の組織病理学的特徴を示すマウスでは、行動レベルの違いも生じることが分かってきており^{7, 9)}、血管周囲の細胞群が脳の機能を調節し、支える重要な役割を担っている可能性が考えられます。脳神経系の疾患には、アルツハイマー型認知症ではアミロイド β 、パーキンソン病では α シヌクレインといった「タンパク質の異常構造体の蓄積」を伴うことが多いことから、実社会にあり得るレベルの環境要因で生じるその現象を制御することは、脳神経系の疾患の治療や予防に活かせる知見を与えるのではないのでしょうか。さらに興味深いことに、このアストロサイトの GFAP 発現亢進を伴う所見は、高齢のマウス脳の血管周囲でも認められます⁸⁾。ここで注目している組織病理学的所見は、加齢がリスク要因になる脳神経系の疾患や、ひいては広く脳の老化そのものに関わっている可能性もあると考えられるのです。

(*6: 光の波数はその電磁波としての振動数のことであり、可視光についてよく用いられる波長の逆数に相当します。光を物質に当てると、その物質が吸収しやすいエネルギー（波数、波長）を持つ光だけが吸収されます。これを利用すると、その吸収スペクトルを計測することで光を当てた物質に含まれる分子や原子の情報を得ることができます。)

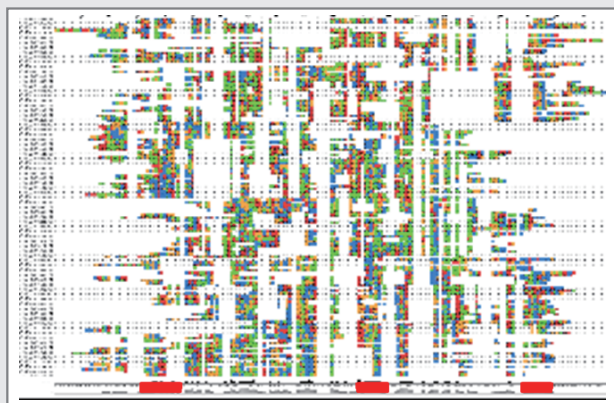


【図 3】 脳血管周囲領域の赤外分光イメージングによるタンパク質二次構造分布の解析
マウスの脳組織切片赤外スペクトルから、領域ごとに存在するタンパク質の二次構造割合をマッピングした結果を示した。各画像には 30 μ m 間隔で格子を設け、各格子内を一領域として赤外スペクトルを測定し、解析に用いている。Onoda ら¹⁰⁾ の図を一部抜粋。

■ 病理形成における長鎖非コード RNA の機能予測

大気汚染モデルであるカーボンブラックナノ粒子によって起こる脳の血管周囲の組織病理について、私たちもその詳細を解明する中で、その病理を抑制するなど制御する方法をまったく見出せないわけではありません。カーボンブラックナノ粒子の影響機序に酸化ストレスが寄与する可能性から、抗酸化剤として N-アセチルシステインやアスコルビン酸（ビタミン C）が、ここまでに述べてきた脳血管周囲の病理の少なくとも一部を抑制することが分かってきました^{12, 13)}。このような既知の化合物に加えて、病理を制御し得る新しい分子にはどのようなものがあるのでしょうか？

私たちはその一つとして、長鎖非コード RNA (long non-coding RNA, 以下 lncRNA と表記します) に注目しています。DNA から転写される RNA というと、先にも述べた遺伝子発現のプロセスに乗りタンパク質の素となる「メッセンジャー RNA (mRNA)」が最も主要なものですが、同時に転写されるもののタンパク質にならない RNA も最近の研究が進んできています。これらはタンパク質をコードしないという意味で「非コード RNA」(non-coding RNA) と呼ばれます。非コード RNA のうち、立体構造や生体内での合成機序、作用機序などが最もよく分かってきたのは、マイクロ RNA (miRNA) という塩基長が 20~25 程度の短いものです。なお、タンパク質をコードする mRNA はヒトの場合 80% 以上が塩基長 1000 以上であり、平均でも塩基長は約 2000 あります。DNA からの遺



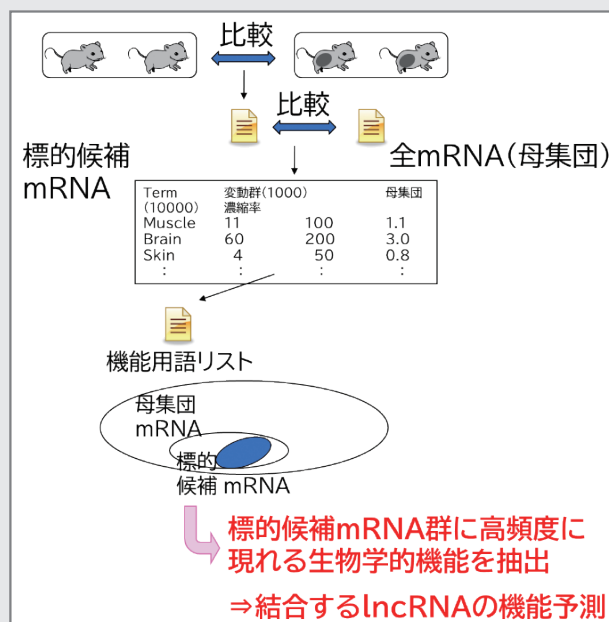
【図 4】脳血管周囲の病変形成に発現量が相関する lncRNA に共通する塩基配列の抽出の一例

上から下に候補となる lncRNA が並び、その塩基配列が各行に示されている。RNA を構成する塩基配列の類似性を考慮してデータを整理するアラインメント解析により、複数の lncRNA の塩基配列に共通する塩基配列が抽出される。(2023 年度東京理科大学修士課程修了・板野凌大さんの解析例)

伝子発現によるタンパク質合成の過程では 3 つの塩基が 1 つのアミノ酸をコードしますので、この事実はヒトのタンパク質が平均してアミノ酸約 700 個から構成されることを意味します。

一方で、非コード RNA にも miRNA のように短いものだけでなく、長鎖のものも生体内で多く存在しています。短い miRNA に対して、約 200 以上の塩基長を持つものが lncRNA と呼ばれます。先に紹介してきた研究^{8, 13)}で、私たちは脳の血管周囲の病変形成に伴って生じる RNA 発現プロファイルのデータを得ていました。すでに解析を終えて報告してきた内容は、他の研究の例に漏れず“タンパク質の元になる” mRNA の部分に限ってできてしまいましたが、取得してきた RNA 発現プロファイルは非常に多くの lncRNA の定量データも含んでいます。言うまでもなく膨大な情報を含むヒトのゲノム DNA は、その 3 分の 2 が RNA に転写されているのに対し、タンパク質をコードしているのは全ゲノムのうちの実は 1.1% に過ぎないことが分かっています(なお、この割合は生物種によって大きく異なり、非コード RNA の割合が大きいのは哺乳類の特徴でもあります)。ヒトのゲノムから作られるタンパク質の種類は 2 万程度であるのに対し、タンパク質にならない lncRNA の種類も約 28000 あると言われています¹⁴⁾。現在、私たちはこの研究の次のステップとして、脳の血管周囲の病理形成における lncRNA 群の機能的寄与の推定に取り組んでいます。

lncRNA の作用機序には、①タンパク質を捕捉して機能を抑制する“decoy”、②タンパク質を機能部位



【図 5】lncRNA の標的候補 mRNA 群の機能予測に活用できる gene set enrichment analysis の概念

に運ぶ“guide”や“scaffold”、③分解により miRNA になる“precursor”や、④ RNA を捕捉してその機能を抑制する“competing endogenous RNA (ceRNA)”があると言われています。このうち、①②③は非コード RNA の立体構造から結合できるタンパク質の探索が必要である一方で、④の機序を介する標的分子は非コード RNA の塩基配列の相補鎖を持つものが候補となるので、塩基配列のみからの標的探索も有効なアプローチになります。私たちはまず、この塩基配列ベースでの lncRNA の機能推定に取り組んでいます。

実際にデータを見ていくと、マウス的大脑皮質で少なくとも約 2 千の lncRNA が、定量性に信頼性のあるレベルでの発現が検出されました。このうち、脳血管周囲病変の程度と発現量がよく相関する lncRNA には、病変形成と何らかの関わりのある可能性がある候補分子が含まれていると考えられます。1000 種類以上の lncRNA についての、塩基配列と発現変動の情報を含むデータは膨大ですが、機械学習をベースにした分析に供することで、病変形成に関わりのある可能性がある lncRNA に特徴的と言える共通の塩基配列をいくつか見出すことができます【図 4】。見出された塩基配列に相補的な配列を持つ mRNA を検索すれば、それを先に述べた④の原理での標的候補分子としてリストアップすることができるわけです。しかし、検索して得られる mRNA リストも膨大です。そこで、mRNA に機能用語を付与(アノテーション)することで、標的候補 mRNA に高頻度に現れる生物学的機能

を統計学的に見出す gene set enrichment analysis (GSEA) という手法が有効になります【図 5】。GSEA を行くと、lncRNA が結合し得る mRNA 群の機能的特徴を見出せるとともに、注目すべき lncRNA の塩基配列の優先順位付けも可能になるのです。

実際に、脳血管周囲の病変形成と相関する lncRNA の共通の塩基配列に「相補的な配列を持つ mRNA」のリストについてこの解析を行った結果、「細胞骨格」や「神経新生」の機能用語がこの mRNA 群に高頻度に現れる機能として抽出されました。細胞骨格は、前述の注記(*5)で示した「GFAP」のアストロサイトにおける主要な機能ですし、「神経新生」は言うまでもなく発達期の脳において重要な現象であり、脳機能の制御に関わる重要な要因でもあります。この結果は、私たちのアプローチによって注目すべきであろうと見出した lncRNA の配列が、脳の機能を支える血管周囲の病理を確かに制御し得る分子である可能性を示唆するものであり、生体内で実際に発揮される作用の検討を現在さらに進めているところです。

■ 機械学習とナノ粒子を活用した研究のこれから

本稿では、脳の機能を支える血管周囲に環境応答的に現れ、脳神経系の疾患と共通の特徴も持つ病理の詳細と、それを制御する新たな研究アプローチの進展を紹介しました。その問題解決には生物学・化学や医学・薬学にすでにある技術だけでなく、膨大なデータを扱える情報処理や計算科学などの技術が必要になってきました。一連の研究から見出される lncRNA を、生体適合性の高い人工ナノ粒子に内包し、脳の機能を制御する試みも始まっています。本稿で紹介したのはその内容のほんの一部分ですが、異なる分野の専門家と連携することによる次の問題解決に今後も期待していただきたいと思います。

参考文献

- 1) 武田健ら「ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠期曝露の子に及ぼす影響」*薬学雑誌*, 131: 229-236 (2011)
- 2) 梅澤雅和ら「ナノ粒子の妊娠期曝露が次世代中枢神経系に及ぼす影響」*薬学雑誌*, 137: 73-78 (2017)
- 3) Lelieveld, *et al.*, The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature*, 525: 367-371 (2015)
- 4) Torkmahalleh and Umezawa, *et al.*, Global air quality and COVID-19 pandemic: Do we breathe cleaner air? *Aerosol and Air Quality Research*, 21: 200567 (2021)

- 5) Umezawa *et al.*, Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J. Toxicol. Sci.*, 37: 1247-1252 (2012)
- 6) Onoda and Umezawa *et al.*, Effects of maternal exposure to ultrafine carbon black on brain perivascular macrophages and surrounding astrocytes in offspring mice. *PLoS One*, 9 (4): e94336 (2014)
- 7) Onoda and Umezawa *et al.*, A novel staining method for detection of brain perivascular injuries induced by nanoparticle: Periodic acid-Schiff and immunohistochemical double-staining. *Front. Toxicol.*, 4: 825984 (2022)
- 8) Onoda, Takeda, and Umezawa, Dose-dependent induction of astrocyte activation and reactive astrogliosis in mouse brain following maternal exposure to carbon black nanoparticle. *Part. Fibre Toxicol.*, 14: 4 (2017)
- 9) Umezawa and Onoda *et al.*, Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neuro-developmental changes in mouse offspring. *Part. Fibre Toxicol.*, 15: 36 (2018)
- 10) Onoda and Umezawa, *et al.*, Perivascular accumulation of β -sheet-rich proteins in offspring brain following maternal exposure to carbon black nanoparticles. *Front. Cell. Neurosci.*, 11: 92 (2017)
- 11) Onoda and Umezawa, *et al.*, Carbon nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress around blood vessels with accumulation of misfolded proteins in the developing brain of offspring. *Sci. Rep.*, 10: 10028 (2020)
- 12) Onoda, Takeda, and Umezawa, Pretreatment with N-acetyl cysteine suppresses chronic reactive astrogliosis following maternal nanoparticle exposure during gestational period. *Nanotoxicology*, 11: 1012-1025 (2017)
- 13) Onoda, Takeda, and Umezawa, Dysregulation of major functional genes in frontal cortex by maternal exposure to carbon black nanoparticle is not ameliorated by ascorbic acid pretreatment. *Sci. Total Environ.*, 634: 1126-1135 (2018)
- 14) Novikova, *et al.*, Rise of the RNA machines: exploring the structure of long non-coding RNAs. *J. Mol. Biol.*, 425: 3731-3746 (2013)

