

THP1 マクロファージに曝露し、NLRP3 インフラマソームを介する濃度依存的な IL-1 β 産生促進を明らかにした。また粒子径の小さな酸化チタンでは、貪食によらない活性化を示唆する知見を得た。本年度は3種の酸化チタンについて、①他の炎症性サイトカイン産生を促進する可能性、②表皮ケラチノサイトにおいてIL-1系炎症性サイトカイン産生を促進する可能性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

被検物質としては、下記の3種類の酸化チタンナノマテリアル（表面未処理）を用いた。

酸化チタン A（粒子径：15 nm）

酸化チタン B（粒子径：35 nm）

酸化チタン C（粒子径：6 nm）

陽性対照とした多層カーボンナノチューブは、MWCNT-SD1（長さ 8 μ m, 径 150 nm）である。サイトカイン測定はミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いて行った。また酸化アルミニウムゲル Alum（免疫グレードアジュバント用）はコスモバイオ株式会社より購入した。Stealth™ Select RNAi（NLRP3）および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

2. MWCNT および HTCFNW の分散

酸化チタンはPBSに50mg/mLの濃度に懸濁し、3-4分間バス型超音波発生装置での処理・vortexを3回繰り返し、ピペッティング、25Gシリンジ通過により分散した。Alumは0.9%NaCl溶液に20mg/mLに懸濁された製品を解凍後 vortex し使用した。MWCNT SD1は0.5%Tween 20を含むPBSに5mg/mLの濃度で懸濁し、1~5分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティング、25Gシリンジ通過により分散した。

3. マクロファージ系細胞からのサイトカイン

放出の測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M PMA と 10%FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化した。さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、各種阻害剤あるいは溶剤で 30 分前処理し、引き続き上記の酸化チタン、Alum、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し各種阻害剤の存在下・非存在下で 6 時間培養した。培養上清を回収し、MILLIPLEX™ MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

4. ケラチノサイトからのサイトカイン放出の測定

ケラチノサイト（ヒト新生児表皮由来）は凍結品を購入し、増殖培地（クラボウ）で6日間コンフルエントまで培養し、増殖培地（増殖因子入り、G+）あるいは0.01%アルコールビン酸0.2%BSAを含むDMEM-F12（増殖因子無し、G-）でさらに24時間培養した。ナノマテリアル曝露は増殖因子無しの培地に添加し、6時間曝露した。培地上清を回収し、サイトカインを測定した。

5. siRNA を用いた NLRP3 のノックダウン

THP-1 細胞を 72 時間 PMA でマクロファージ様に分化したのち、Stealth™ Select RNAi（NLRP3, sense2 および antisense2）あるいは Stealth RNAi negative control を lipofectamine RNAi MAX 試薬(Invitrogen) を用いて細胞に導入し、24 時間後に酸化チタンならびに Alum に 6 時間曝露した。培養上清を回収し、サイトカイン濃度の測定を行った。

6. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

mRNA は定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。細胞から RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、DNAse 処理を行い、

QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて ABI Prism 7300 で測定した。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

C. 研究結果

1. 酸化チタンナノマテリアルはマクロファージ系細胞からの TNF α 産生を促進する

昨年度の研究において、3 種類の酸化チタンナノマテリアル A, B および C を THP-1 マクロファージに曝露すると、濃度依存的に IL-1 β 産生を促進すること、その効果は ALUM とほぼ同定程度であり、NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにしている。

今年度は他の炎症性サイトカインに及ぼす影響を検討した。TNF α 産生促進は、酸化チタンナノマテリアル (A~C)、ALUM のいずれによっても濃度 (50~125 μ g/mL) 依存的な効果が認められた (図 1 A, B)。また酸化チタンナノマテリアル (A~C) (50~250 μ g/mL) については IL-6 産生の促進を確認した (図 C)。IL-6 産生については粒子径が大きいほど効果がより強力である傾向が認められた。

2. 酸化チタンナノマテリアルは NLRP3-caspase1 を介して TNF α 産生を促進する

酸化チタンナノマテリアル (A~C) および Alum の TNF α 産生効果は、細胞の NLRP3 を特異的 siRNA で処理し、NLRP3 をノックダウンすると (図 2B)、ほぼ完全に抑制された (図 2C)。また、caspase1 阻害剤 z-YVAD-fmkによっても完全な抑制が認められた (図 2A)。

3. 酸化チタンナノマテリアルによる TNF α 産生に対する食食阻害剤の影響は粒子により異なる

THP-1 マクロファージの食食作用を阻害剤 cytochalacin D (Cyt D) で抑制すると、多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 による TNF α 産生促進は 0.2 μ M Cyt D でほぼ完全に抑制された (図 3)。一方、酸化チタンナノマテ

リアル (A~C) による TNF α 産生は 0.2 μ M Cyt D では全く影響されなかった。Cyt D を 1 μ M に上昇させると、酸化チタン A および B による産生は 60~50%抑制されたが、酸化チタン C では全く影響されず、食食阻害剤の効果は粒子により異なることが判明した。Alum による産生誘導は、濃度に応じて 60-90%抑制された。

4. 表皮角化細胞を用いた評価手法の検討

培養ヒト角化細胞を用いて IL-1 β および IL-1 α の分泌誘導効果を検討したところ、酸化チタン粒子 A, B および C は全く効果を示さなかった。マクロファージでは強力な効果を示す多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 の曝露、あるいは NLRP3 インフラマソームを直接活性化する nigericin (3.4 μ M) あるいは ATP (3mM) を培地に添加した場合も、全く効果が認められなかった。

そこで角化細胞の NLRP3、IL-1 β および caspase-1 の mRNA 発現量を測定したところ、NLRP3 および IL-1 β の発現は増殖因子により低下していた。NLRP3 の発現量は、増殖因子無しでも THP-1 マクロファージの 0.1%以下であり、著しく低いことが判明した。一方、caspase-1 の発現量は THP-1 の 220~300%に相当し、IL-1 β では 20~40%であった。

D. 考察

本分担課題は、in vitro でのアジュバント活性評価系の確立ならびに酸化チタンナノマテリアルの活性評価を目的とする。抗原免疫時のアジュバント作用においては、炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を誘導する NLRP3 インフラマソームが決定的な役割を果たすことから、細胞での NLRP3 インフラマソーム活性化をアジュバント活性の指標とすることを検討した。

昨年度までの研究において、THP-1 マクロファージを用い、一般的なアジュバントである Alum が NLRP3 依存的に IL-1 β を産生する応答

を評価する系を確立し、3種類の酸化チタンナノ材料がいずれも、NLRP3 依存的に濃度に応じた IL-1 β 産生を促進することを明らかにした。

今年度は引き続き他の炎症性サイトカイン産生への影響について検討し、Alum および酸化チタンは、THP-1 マクロファージにおいて TNF α ならびに IL-6 の分泌も促進することを示した。TNF α 分泌応答も NLRP3 インフラマソームに依存していた。この結果は、ナノ材料が直接に TLR 経路を活性化するよりは、NLRP3 活性化を介して産生された IL-1 系サイトカインが autocrine により二次的応答を誘導した可能性が高いと推定され、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を支持するものと考えられる。

また IL-1 β と同様 TNF α 分泌応答においても、食害阻害剤の影響は酸化チタン粒子により異なっていた。サイズが小さい酸化チタン C は阻害剤に全く影響されないことから、食害されずに細胞膜を透過して NLRP3 インフラマソームを活性化した可能性が示唆される。

経皮暴露において、サイズが小さい酸化チタン粒子は表皮ケラチノサイトに直接侵入し、インフラマソームを活性化する可能性が示唆される。そこで、培養ヒトケラチノサイトを用いて IL-1 β ならびに IL-1 α 分泌への影響を検討した。しかしながら、酸化チタン A~C のみならず、マクロファージでは強力な NLRP3 活性化

を引き起こす多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1、細胞外への K⁺流出により直接 NLRP3 を活性化する ATP や nigericin のいずれを曝露した場合でも、全く応答が認められなかった。これはケラチノサイトでは、THP1 細胞に比較し、インフラマソーム構成成分 caspase-1 や IL-1 β の発現はほぼ同程度であったが、NLRP3 の発現が 0.1% 以下と著しく低いことが原因と考えている。表皮ケラチノサイトの NLRP3 インフラマソームは、UV 照射等により誘導されることが報告されていることから、ケラチノサイトを用いる際には IL-1 β 前駆体やインフラマソーム構成成分を発現誘導する過程 “priming” が必要と考えられ、今後、条件の検討を行う予定である。

E. 結論

アジュバント活性の *in vitro* 評価手法の検討を行い、マクロファージ系培養細胞において、酸化チタン粒子が濃度ならびに NLRP3 依存的な TNF α 分泌促進活性を有することを示した。IL-6 産生促進も認められた。一方ケラチノサイトにおいては、NLRP3 発現が著しく低く、IL-1 系サイトカイン産生応答は全く認められなかった。

F. 研究発表

該当なし

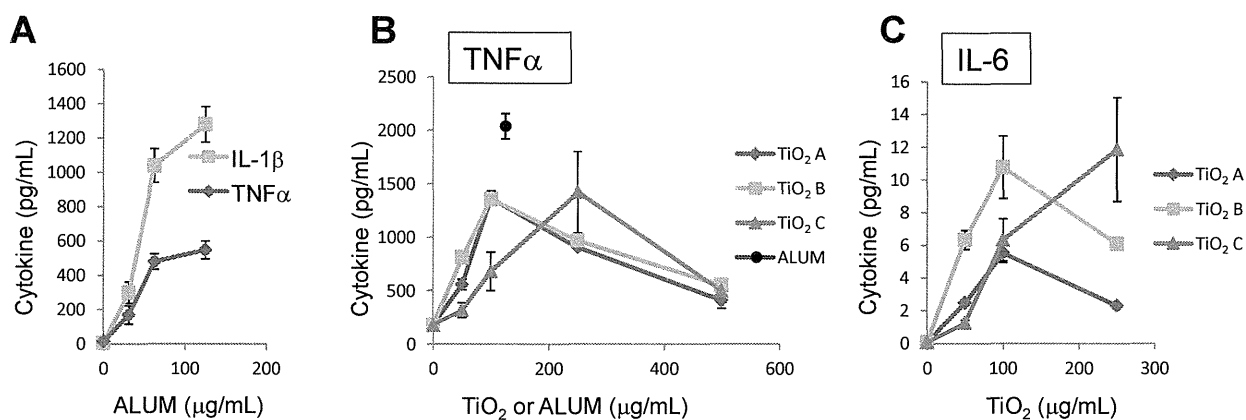


図1. 酸化チタンナノ材料(A,B,C)ならびにALUMはTHP-1マクロファージからのTNF α ならびにIL-6の分泌を促進する

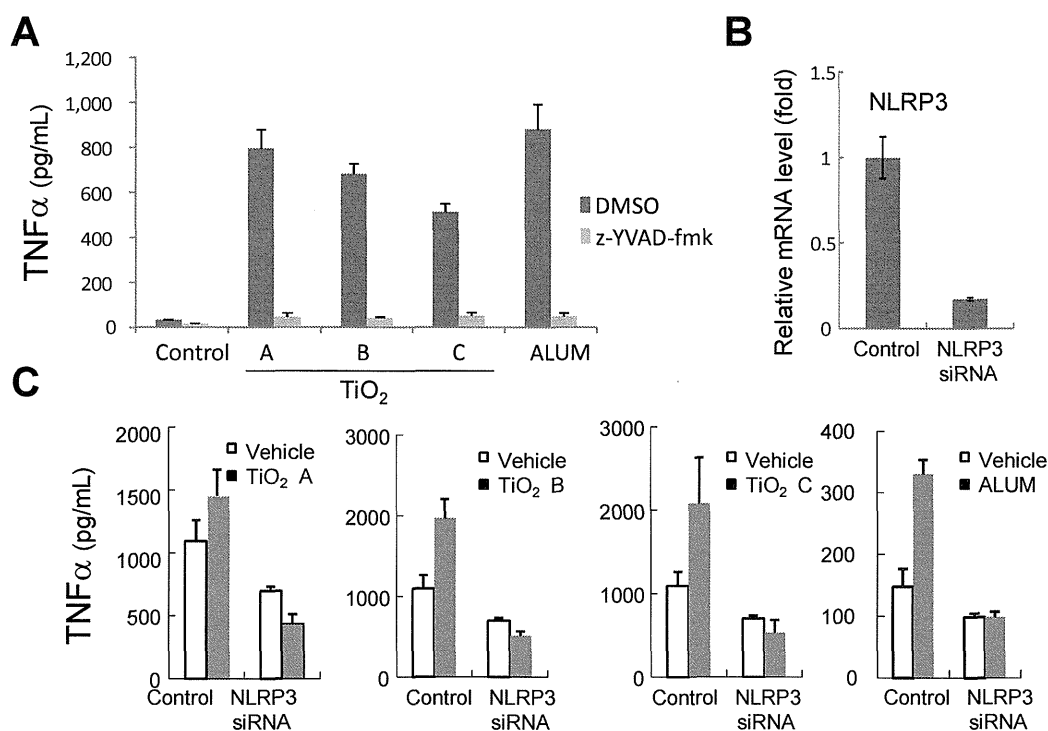


図2. 酸化チタンナノ材料ならびにALUMによるTHP-1マクロファージからのTNF α 分泌促進は、caspase-1阻害剤処理(A)あるいはNLRP3のsiRNAノックダウン(C)により抑制される。ノックダウンの評価には mRNAレベル(B)を測定した。

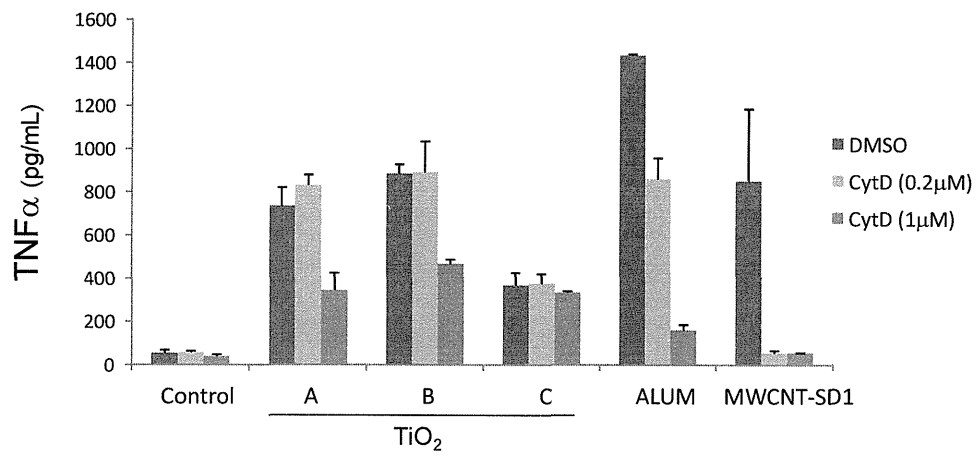


図3. 酸化チタンナノ材料によるTHP-1マクロファージからのTNF α 分泌促進はMWCNTによる分泌とは異なり、食食阻害剤 (cytochalasin D) による抑制を受けにくい

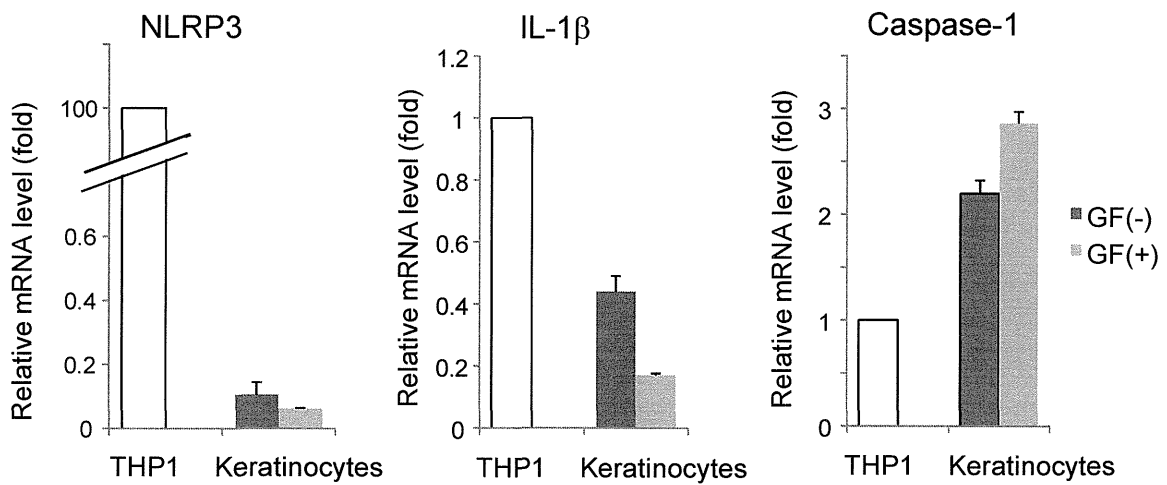


図4. 培養表皮ケラチノサイトおよび分化THP1細胞におけるNLRP3、IL-1 β 、caspase-1のmRNA発現レベル

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

