

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に関する
評価手法の開発研究

分担研究課題名：ナノマテリアルのアジュバント活性に関する貪食細胞を用いた
in vitro 評価手法の開発研究

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者： 崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 研究助手

研究要旨

本分担研究では in vitro でのアジュバント活性評価系を NLRP3 インフラマソーム活性化に着目して確立し、酸化チタン等のナノマテリアルの活性を明らかにすることを目的としている。これまで THP-1 マクロファージにおいて、3 種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも IL-1 と同様に、NLRP3 インフラマソーム依存的に TNF 産生を促進する応答を見いだしている。今年度はその解析を行い、酸化チタンが産生する IL-1 の autocrine 作用により TNF 産生が促進される機序を明らかにした。一方、IL-1 産生促進において酸化チタンのルチル型・アナタース型の顕著な違いは認められず、酸化亜鉛ナノマテリアルは IL-1 ・TNF 産生に全く効果を示さないことが判明した。

A．研究目的

抗原免疫時に水酸化アルミニウム（Alum）がアジュバント効果を発揮するには、NLRP3 インフラマソーム活性化による IL-1 系炎症性サイトカイン産生が決定的な役割を持ち、Alum のアジュバント作用はインフラマソームを構成する NLRP3 や caspase-1 ノックアウトマウスでは失われることが報告されている。

本研究班は、酸化チタン等のナノマテリアル経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作を増強する可能性を検証し、ナノマテリアルのアジュバント効果を in vivo 及び in vitro で評価する系を開発することを目的としている。本研究においては、in vitro 評価法として、細胞を用いた NLRP3 活性化の評価法とその妥当性について検討を行う。

昨年度までの研究において、3 種の酸化チタンを 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 産生

促進を明らかにした。引き続き TNF 産生促進とその応答が NLRP3 を介することを見いだしている。本年度は NLRP3 を介する TNF 産生促進の機構を解析するとともに、IL-1 産生への酸化チタンのルチル型・アナタース型による効果の違い、酸化亜鉛ナノマテリアルの効果について検討した。また 表皮ケラチノサイトにおける NLRP3 インフラマソームについて基礎的検討を行った。

B．研究方法

1．実験材料および試薬

被検物質としては、下記のナノマテリアル（表面未処理）を主に用いた。

酸化チタン A（ルチル型、粒子径：15 nm）

酸化チタン D（アナタース型、粒子径：15 nm）

酸化亜鉛 MZ-500（粒子径：25nm）

陽性対照として多層カーボンナノチューブ

MWCNT-SD1 (長さ 8 μm , 径 150 nm) を用いた。

2. ナノマテリアルの分散

酸化チタンおよび酸化亜鉛ナノマテリアルは 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 回繰り返す、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。MWCNT-SD1 は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/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 μM 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、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 (Epilife、HKGS 含有) で 6 日間コンフルエントまで培養し、分化培地 (Epilife、1.2mM Ca^{2+} 含有) でさらに 24 時間培養した。LPS (0、25 あるいは 125pg/mL) を 6 時間あるいは 24 時間曝露したのち、5 μM ionomycin (1.5mM Ca^{2+} 含有 Epilife 培地) でインフラマソームを活性化した。2 時間後に培地上清を回収し、サイトカインを測定した。

5. 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による TNF 産生促進の機構

昨年度の研究において、酸化チタンナノマテリアル A~C 暴露により TNF が産生されること、さらにこの応答は NLRP3 ノックダウンおよび caspase-1 阻害により抑制され、IL-1 分泌と同様に NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにした。本年度は酸化チタンによる TNF 産生促進の機構を解析した。酸化チタン A による TNF 産生は、I- κ B キナーゼ阻害剤である ML120B により完全に抑制され、IL-1 受容体アンタゴニストの共存によっても抑制された (図 1)。したがって、酸化チタンにより分泌される IL-1 が IL-1 受容体を活性化し、この autocrine 作用により NF- κ B 活性化を介して TNF が産生される機序が推察される。

2. 酸化チタンナノマテリアルの物理化学的性状の影響

酸化チタンナノマテリアルの表面構造の違いが IL-1 産生に及ぼす影響を、同一の平均一次粒子径 (15nm) を有するルチル型の酸化チタン A とアナタース型の酸化チタン D を用いて比較検討したところ、どちらもほぼ同程度の IL-1 分泌促進を示した (図 2A)。またいずれの場合も、低濃度の食害阻害剤 cytochalacin D が IL-1 分泌をむしろ促進する効果が認められた。

一方、平均一次粒子径 25nm の酸化亜鉛ナノマテリアルについては、5~50 $\mu\text{g/mL}$ 、あるいは 50~250 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において検討を行ったが、IL-1 ならびに TNF 産生の促進効果は全く認められなかった (図 2B~D)。

3. ケラチノサイトを用いた評価手法の検討

昨年度、培養ヒトケラチノサイトを用い、酸化チタンナノマテリアルによる IL-1 ならびに IL-1 分泌促進の可能性を検討したが、酸化チタン粒子のみならず、NLRP3 インフラマソームを直接活性化することが知られる nigericin や ATP 刺激によっても IL-1・TNF 産生は全く認められなかった。ヒトケラチノサイトでは NLRP3 の mRNA 発現量が、THP-1 マクロファージの 0.1~0.5%と著しく低いことが判明したことから、本年度は、NLRP3 などインフラマソーム関連遺伝子発現の誘導 (priming) を試みた。

ヒトケラチノサイトを 1.2 mM カルシウム処理により分化誘導し、さらに代表的な priming 剤である LPS を 6 時間あるいは 24 時間処理したが、NLRP3、IL-1 前駆体、caspase-1 の mRNA レベルはやや低下、あるいは全く影響されなかった (図 3)。引き続きケラチノサイトでのインフラマソーム活性化の報告がある ionomycin を用いて刺激を行ったが、培地中に IL-1、IL-1 は全く検出されなかった。

D. 考察

抗原免疫時に Alum がアジュバント作用を発揮する際には、炎症性サイトカイン IL-1 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が報告されている。昨年度までに THP-1 マクロファージを用い、Alum ならびに 3 種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも、濃度に応じて NLRP3 依存的に IL-1 産生を促進することを明らかにした。引き続き炎症性サイトカイン TNF ならびに IL-6 の分泌も促進され、TNF α 分泌応答も NLRP3 インフラマソームに依存することを見いだしている。

今年度は TNF 産生促進の機構を解析した。TNF 産生については、TLR 刺激が NF- κ B 活性化・転写誘導を介して産生を促進する経路が知られている。実際、酸化チタンナノマテリアルによる産生は NF- κ B 阻害剤により完全に抑制され、

さらに IL-1 受容体アンタゴニストによっても抑制されることが判明した。したがって、酸化チタンが直接 NF- κ B を活性化するよりはむしろ、酸化チタンが NLRP3 を活性化して産生された IL-1 が、autocrine により二次的に IL-1 受容体を活性化し、NF- κ B 活性化を介して TNF 分泌を誘導した可能性が強く示唆される。この結果はまた、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を強く支持すると考えられる。

一方、酸化チタンナノマテリアルの表面構造の違いによる影響を、同一の平均一次粒子径 (15nm) を有するルチル型とアナターズ型で比較したが、IL-1 産生促進の効果は同程度であった。また、酸化亜鉛ナノマテリアルは IL-1 ならびに TNF 産生を全く誘導しなかった。HUVEC では高濃度の酸化亜鉛ナノマテリアルがアポトーシスを誘導する報告から、より低濃度までの検討も行ったが、IL-1・TNF は産生されなかった。

昨年度までの成果から、サイズが小さい酸化チタン粒子は経皮暴露において表皮ケラチノサイトのインフラマソームを直接活性化する可能性が考えられる。そこで培養ヒトケラチノサイトでの NLRP3 活性化/IL-1・TNF 産生への影響を解析したが、ケラチノサイトには NLRP3 が全く発現せず、酸化チタン A~C や ionomycin 刺激により IL-1・TNF 産生促進は全く認められなかった。一部の報告では、UV 照射により表皮ケラチノサイトの NLRP3 インフラマソームが誘導されることから、ケラチノサイトでは IL-1 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” が必要と考えられた。そこで本年度はケラチノサイトの分化誘導処理や priming 効果の知られる LPS 処理を試みたが、NLRP3 は全く発現誘導されなかった。一方、ケラチノサイトの IL-1 前駆体の発現量は THP-1 マクロファージの 20~40%、caspase-1 は 220~300%に相当することから、ケラチノサイトにインフラマソームは存在するものの、酸化チタン A~C 刺激には応答しないタイプのインフラマソームと推定される。関連論文を精査すると、ケラチノサイトではウィルス感

染時などに NLRP3 以外のインフラマソームが機能する可能性が示唆されている。

E . 結論

マクロファージ系培養細胞において、酸化チタンが autocrine 作用により TNF α 産生を促進する機構を明らかにした。IL-1 β ・TNF α 産生におい

て、酸化チタンのルチル型・アナターズ型による顕著な違いは認められず、酸化亜鉛ナノマテリアルは全く効果を示さなかった。

F . 研究発表

該当なし

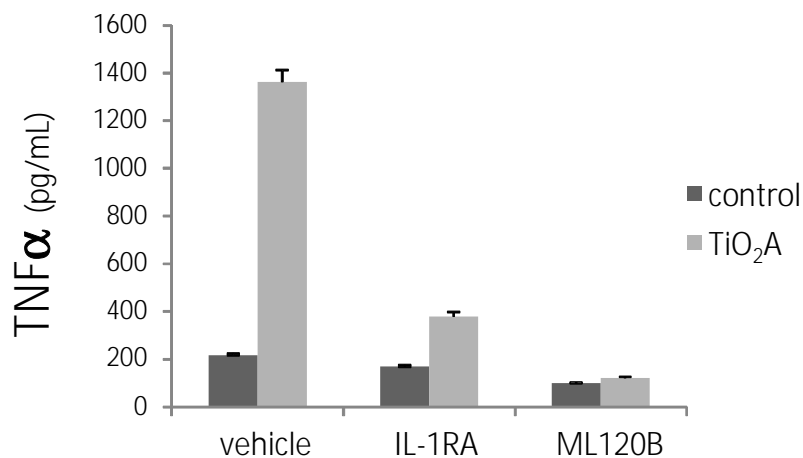


図1 . 酸化チタンナノマテリアルによるTNF α 産生誘導に及ぼすIL-1受容体アンタゴニスト(IL-1RA)ならびにNF- κ B阻害剤(ML120B)の影響

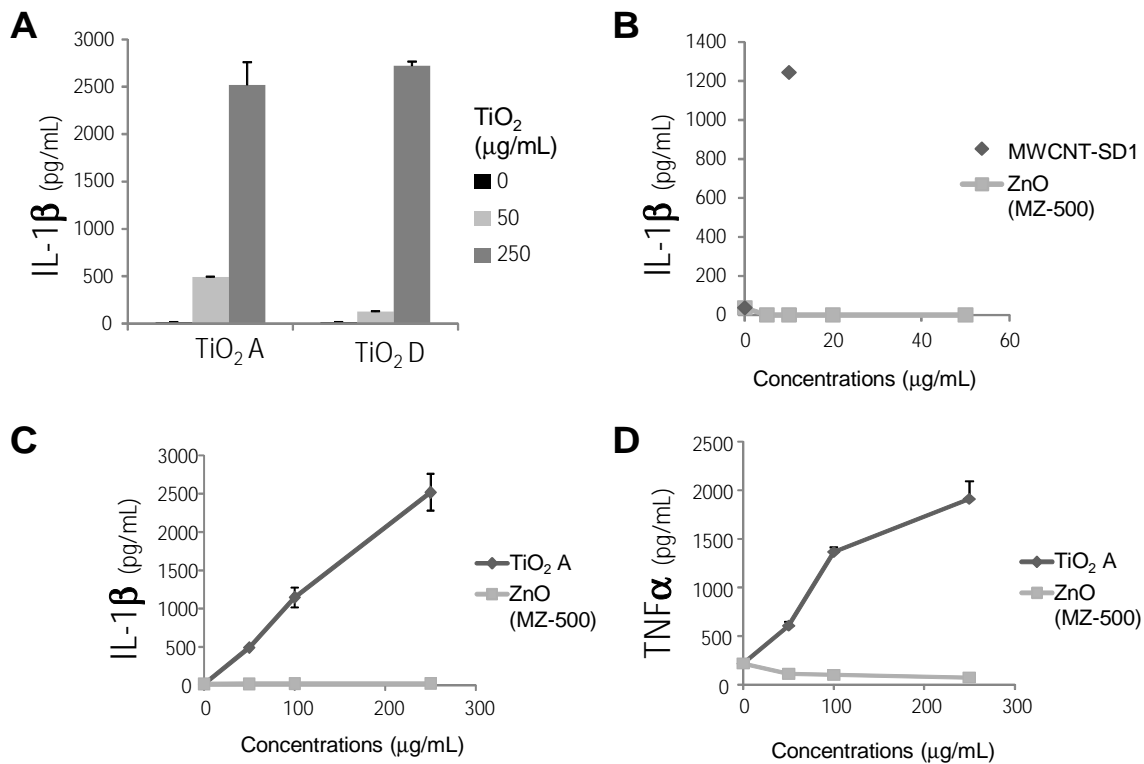


図2. 炎症性サイトカイン産生に及ぼす酸化チタンのルチル型・アナターズ型の影響 (A) ならびに酸化亜鉛の効果 (B,C,D)

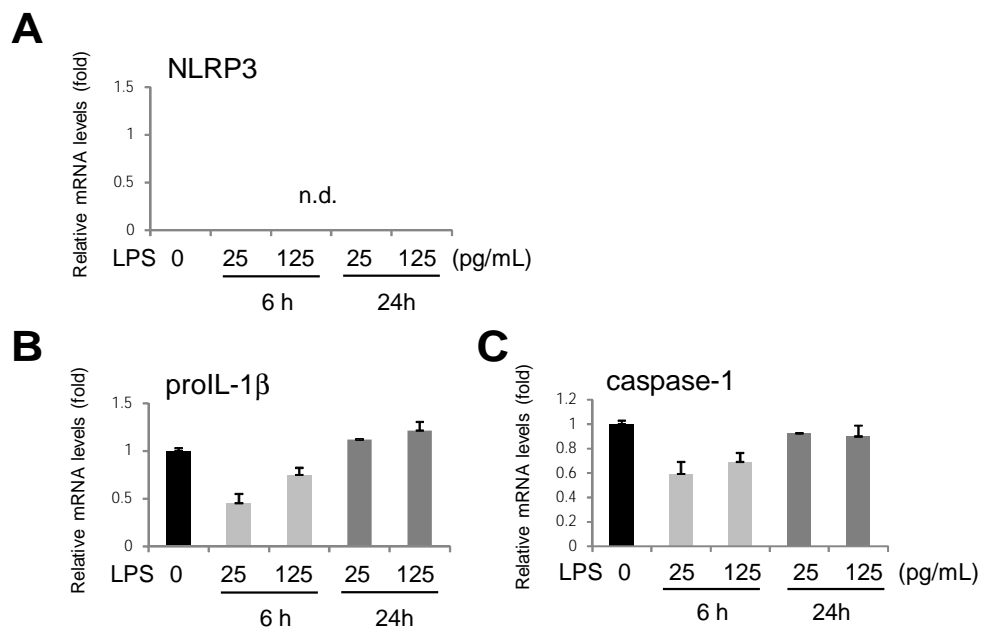


図3. 培養ヒトケラチノサイトにおけるインフラマソーム構成因子の発現ならびにLPS処理の影響