

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究

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

研究要旨

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の毒性と慢性炎症との関連が注目されている。今年度は、長さや径の異なる各種 MWCNT について、マクロファージからの炎症性サイトカイン TNF α 産生誘導能について検討を行った。MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 はいずれも強力に TNF α 産生を促進した。いずれの MWCNT の場合にも、TNF α 分泌促進には貪食過程が必要とされ、NLRP3 ノックダウンと caspase-1 阻害が顕著な抑制効果を示すこと、リソソーム酵素 cathepsin B 阻害剤は部分的抑制効果を示すことが判明した。したがって各種 MWCNT による TNF α 産生も、NLRP3 インフラマソームを介する応答であることが明らかになった。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルとして用いられる多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は、アスベストと似た形状を持ち、ヒトへの健康影響が懸念されている。暴露され体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の貪食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応である。本研究ではナノマテリアルの貪食系細胞内での挙動を追跡し、インフラマソーム活性化を介した炎症の慢性化機構を明らかにし、慢性影響の評価につなげることを目的とする。

これまでの研究において、長さや径の異なるさまざまな針状の多層カーボンナノチューブについて、マクロファージに暴露すると、炎症性サイトカイン IL-1 β を強力に産生すること、その過程には NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームが関与することを明らかにしている。NLRP3 は様々な慢性炎症疾患に関与することが最近明らかにされており、また IL-1 β は免

疫細胞の活性化や炎症応答の誘導などの多彩な役割を有している。MWCNT が排除されずに細胞組織に滞れば、炎症が慢性化することが懸念される。

今年度は長さや径が様々な MWCNT を対象に、炎症性サイトカイン TNF α 産生促進能とインフラマソームの役割を解析した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では以下の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を使用した。MWCNT-WL（長さ 0.5-10 μ m、径 85-200 nm）ならびに MWCNT-WS（長さ 0.5-2 μ m、径 40-70 nm）は和光純薬工業（株）より、MWCNT-T（長さ数 10-数 100 μ m、径 70-150 nm）は戸田工業（株）より入手した。MWCNT-SD1（平均長 4.51 μ m、径 150 nm）は昭和電工より提供された。

サイトカイン測定にはミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いた。

Stealth™ Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

2. MWCNT の分散

MWCNT-SD1、-WL、-WS、および-T 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 シリンジを通過し分散した。

3. 細胞からの TNF α 分泌測定

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、さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.002% とした。培養上清を回収後、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。

C. 研究結果

1. 各種 MWCNT による TNF α 産生

THP-1 マクロファージを MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 を 3、6、10 μ g/mL の濃度で処理すると、TNF α 産生促進が認められ、MWCNT-SD1 が最も顕著な効果を示した。10 μ g/mL の濃度では、MWCNT-T、MWCNT-WL、MWCNT-WS の順で効果は減弱したが、6 μ g/mL では MWCNT-T、-WL、-WS に大きな違いは認められなかった。

マクロファージを cytochalasin D (0.2 μ M) で前処理すると、MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 (10 μ g/mL) による TNF α 産生はほぼ完全に消失し、各 MWCNT による TNF α 産生には貪食過程が必要であることが判明した。

2. NLRP3 インフラマソームの関与

これまで MWCNT-M、-SD1、HTCFNW-L、MWCNT-WL、WS、T など各種針状カーボンナ

ノマテリアルによる IL-1 β 産生には、NLRP3 インフラマソームが関与することを明らかにしている。MWCNT-WL、-WS および-T による TNF α 産生への NLRP3 の関与を、特異的 siRNA による NLRP3 ノックダウンにより解析した。NLRP3 siRNA 処理により細胞内の NLRP3 mRNA は 80% 低下し、MWCNT-SD-1 (10 μ g/mL) および-WL による TNF α 分泌は 90%、MWCNT-WS および-T による TNF α 分泌はほぼ完全に阻害され、NLRP3 の関与が示された。また。さらにインフラマソームを構成する caspase-1 の特異的阻害剤 z-YVAD-FMK (10 μ M) で細胞を前処理したところ、MWCNT-SD-1、-WS および-T (10 μ g/mL) による TNF α 分泌はそれぞれ 90%、100%、100% 阻害された。MWCNT-WL による TNF α のみ阻害は 70% に留まった。

リソソーム酵素である cathepsin B の阻害剤 CA-074Me (10 μ M) 処理により、MWCNT-SD-1、-WL、-WS および-T (10 μ g/mL) による TNF α 分泌はそれぞれ 70%、70%、65%、65% 阻害された。

D. 考察

昨年度は多様な長さや径を有する様々な MWCNT について、IL-1 β 産生能を明らかにし、インフラマソーム活性化の関与と機序を解析した。今年度は、これらの MWCNT が代表的な炎症性サイトカインである TNF α 産生に及ぼす影響とその機序について検討を加えた。

各種 MWCNT をマクロファージに曝露すると、TNF α 産生が顕著に促進されること、さらにこの応答には、IL-1 β の場合と同様に、貪食ならびに NLRP3 インフラマソーム、caspase-1 活性、リソソーム酵素 cathepsin B の関与が明らかになった。

IL-1 β の場合は、インフラマソームがシグナルを受けると caspase-1 が自己切断され、活性型の caspase-1 が IL-1 β 前駆体を切断して産生されることが知られている。またアスベスト様の針状化合物は細胞に貪食されるとエンドソーム・リソソーム膜を破壊し、リソソーム酵素カテプシン B の

漏出が NLRP3 インフラマソーム活性化を導く可能性が示唆されている。

一方、TNF α は転写・翻訳産物そのまま細胞外に分泌され、LPS などの TLR4 リガンドが TNF α 遺伝子転写を誘導し分泌促進をもたらす機構が知られている。しかしながら本研究の結果は、各種 MWCNT による TNF α 分泌促進作用には IL-1 β 産生のためのプロセスとマシナリー、すなわち貪食・リソソーム破壊・NLRP3 インフラマソームが関わることを示している。分泌された IL-1 β は IL-1 受容体を介して TNF α 産生を促進することが可能であることから、MWCNT 刺激により分泌された IL-1 β が TNF α 分泌を促進するオートライン機構の可能性が推定される。

E. 結論

様々な長さ・径をもつ MWCNT がマクロファージからの TNF α 産生を促進し、その応答は NLRP3 インフラマソーム活性化を介することを明らかにした。

F. 研究発表

該当なし

表1. 各種MWCNTによるTNF α 産生

		MWCNT-SD1	MWCNT-WL	MWCNT-WS	MWCNT-T
Length		Ave: 4.51 μm	0.5-10 μm	0.5-2 μm	数10~数100 μm
Diameter		(150 nm)	85-200 nm	40-70 nm	20-100 nm
TNF α secretion		++++	++	++	+++
Phagocytosis	Cytochalasin D (Inhibitor)	Inhibition	85% Inhibition	Inhibition	Inhibition
Lysosomal cathepsin B	CA-074Me (Inhibitor)	70% Inhibition	70% Inhibition	65% Inhibition	65% Inhibition
Inflammasomes					
NLRP3	siRNA knockdown	90% Inhibition	90% Inhibition	Inhibition	Inhibition
caspase-1	zVAD-fmk (Inhibitor)	90% Inhibition	70% Inhibition	Inhibition	Inhibition