

平成30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:カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リスクの  
新規高効率評価手法の開発

分担研究課題名:カーボンナノチューブ吸入暴露による気道クリアランスと  
肺胞マクロファージへの影響

分担研究者 山村寿男 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野 教授  
研究協力者 神藤秀基 名古屋市立大学薬学部薬学研究科細胞分子薬効解析学分野博士前期課程  
鈴木良明 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野 講師  
今泉祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科 特任教授

## 研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器に対する毒性および発がん機構を解明する上で、被検物暴露の初期における直接的な細胞障害性を明らかにすることは重要である。本年度は、肺内の炎症反応に関与する肺胞マクロファージ(AM)に着目し、MWCNTが肺で炎症反応を誘導する機構の解明を目指した。MWCNT暴露によるAMの細胞死機構を明らかにするため、アポトーシスが生じるか調べた。Caspase-3/7活性測定とAnnexin V/PI染色の結果、MWCNT暴露によるAMの細胞死機構は、アポトーシスではないことが推測された。次に、ネクロトーシスの一種であるパイロトーシスが生じるか調べた。パイロトーシスに関与するインフラマソームが制御するIL-1 $\beta$ 分泌についてELISA法で測定した結果、MWCNT暴露によるAMの細胞死機構は、インフラマソーム形成を伴うパイロトーシスであることが示唆された。パイロトーシスを起こしたAMからは、IL-1 $\beta$ が放出され、肺の慢性的な炎症が起き、中皮腫が発生することが考えられる。

## A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は、導電性や強度、化学反応性に優れているため、電池や半導体など様々な分野に応用されており、今後も使用量や応用分野は拡大すると考えられる。しかし、MWCNTの形状がアスベストと類似していることから、発がん性が懸念され、安全性研究が喫緊の課題である。

本研究では、肺内の炎症反応に関与する肺胞マクロファージ(AM)に着目し、MWCNTによる細胞障害を解析することで、MWCNTが肺で炎症反応を誘導する機構の解明を目指した。

## B. 研究方法

### 1)AMの単離法

雄性ラット(Wistar/ST、8~10週齢)から気管および肺を摘出した。気管からカニューレを挿入し、5 mLのPBS(-)を注入し、回収した。これを6回繰り返し、肺胞洗浄液を得た。肺胞洗浄液を4°C、500 $\times$ g、10 minで遠心した後、上清を除いてAMを得た。

### 2)Caspase-3/7試験

単離したAMを10<sup>4</sup> cells/wellで96穴プレートに播種し、10  $\mu$ g/mL MWCNTを添加した。溶媒群では

0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。2 h、1 d、7 d 培養後、Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いてアポトーシスアッセイを行った。ポジティブコントロールとして、5  $\mu$ M staurosporine で 4 h 処理することでアポトーシスを誘導した。

### 3) Annexin V/PI 染色法

単離した AM を  $10^5$  細胞ずつシャーレに播種し、10  $\mu$ g/mL MWCNT を添加した。溶媒群では 0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。5 h、1 d、3 d 培養後、Annexin V:FITC Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いてアポトーシスアッセイを行った。蛍光の測定には BD FACS Verse (BD Biosciences) を用いた。

### 4) ELISA 法

単離した AM を  $2 \times 10^4$  cells/well で 96 well プレートに播種した。リポ多糖(LPS) 刺激群は、1  $\mu$ g/mL LPS で 2 h 刺激した。洗浄後、10  $\mu$ g/mL MWCNT を添加した。溶媒群では 0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。5 h、1 d、3 d、7 d 培養後、プレートを 1800 rpm で 3 min 遠心してから上清を採取し、サンプルとした。IL-1 $\beta$  の測定には、Rat IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を使用した。IL-1 $\alpha$  の測定には Rat IL-1 $\alpha$ /IL-1F1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を使用した。サンプルの吸光度は 1420 ARVO マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) を用いて測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に基づき適正に行った。本実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会で承認済である(承認番号:H30-P-1)。

## C. 研究結果

### 1) MWCNT 暴露における AM のアポトーシス解析 (caspase-3/7 活性)

MWCNT 暴露による AM の細胞死機構を明らかにするために、まずアポトーシスが生じるか調べた。

アポトーシスに關与する caspase-3/7 の活性を測定した結果、MWCNT 暴露による caspase-3/7 活性の増加は検出されなかった

(2 h, Vehicle= $21.4 \pm 0.8 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-L= $15.7 \pm 1.6 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-S= $17.0 \pm 0.8 \times 10^2$ , n=3; 1 d, Vehicle= $25.5 \pm 13.3 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-L= $7.8 \pm 2.8 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-S= $5.7 \pm 0.9 \times 10^2$ , n=3; 7 d, Vehicle= $10.6 \pm 1.1 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-L= $12.6 \pm 0.2 \times 10^2$ , n=3, MWCNT-S= $11.3 \pm 1.3 \times 10^2$ , n=3; Staurosporine= $204.5 \pm 80.0 \times 10^2$ , n=3)。

### 2) MWCNT 暴露における AM のアポトーシス解析 (Annexin V/PI 染色)

Annexin V/PI 染色によってもアポトーシスが生じるか調べた。MWCNT-L に 5 h 暴露することで、Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が、MWCNT-S 暴露群に対して有意に減少した。溶媒群に対しては減少傾向にあった (Vehicle= $96.2 \pm 1.6\%$ , n=4, MWCNT-L= $93.1 \pm 0.7\%$ , n=4, MWCNT-S= $97.9 \pm 0.2\%$ , n=4)。MWCNT-L に 1 d 暴露することで、Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が溶媒群に対しても有意に減少し (Vehicle= $97.0 \pm 0.2\%$ , n=5, MWCNT-L= $82.2 \pm 2.7\%$ , n=5, MWCNT-S= $95.2 \pm 0.6\%$ , n=5)、Annexin V(+)/PI(+)の細胞の割合は残りの群に対して有意に増加した (Vehicle= $1.0 \pm 0.2\%$ , n=5, MWCNT-L= $5.3 \pm 0.9\%$ , n=5, MWCNT-S= $2.1 \pm 0.4\%$ , n=5)。MWCNT-S については、3 d 暴露することで Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が溶媒群に対して有意に減少し (Vehicle= $80.4 \pm 2.4\%$ , n=7, MWCNT-L= $59.0 \pm 2.7\%$ , n=7, MWCNT-S= $67.9 \pm 4.4\%$ , n=7)、Annexin V(+)/PI(+)の細胞の割合が溶媒群に対して有意に増加した (Vehicle= $5.6 \pm 1.4\%$ , n=7, MWCNT-L= $18.7 \pm 1.9\%$ , n=7, MWCNT-S= $13.2 \pm 1.8\%$ , n=7)。実験を行ったいずれの時間においても Annexin V(+)/PI(-)の早期アポトーシスを示す細胞の割合は増加しなかった (5 h, Vehicle= $1.6 \pm 0.5\%$ , n=4, MWCNT-L= $1.0 \pm 0.4\%$ , n=4,

MWCNT-S=0.9±0.4%, n=4; 1 d, Vehicle=1.7±0.1%, n=5, MWCNT-L=4.2±1.2%, n=5,  
MWCNT-S=1.8±0.2%, n=5; 3 d, Vehicle=12.5 ± 2.5%, n=7, MWCNT-L=12.1±2.9%, n=7,  
MWCNT-S=4.9±1.2%, n=7)。

### 3) MWCNT 暴露における AM のサイトカイン発現解析

ネクローシスの一種であるパイロトーシスが生じるか調べた。パイロトーシスに関与するインフラマソームが制御する IL-1 $\beta$ 分泌について ELISA 法で測定した。IL-1 $\beta$ の分泌は、LPS 刺激群において MWCNT 暴露 3 d 後と 7 d 後に溶媒群に対して有意に上昇した (3 d LPS(+), Vehicle=-2.6±8.4 pg/mL, n=3, MWCNT-L=88.8±25.1 pg/mL, n=3, MWCNT-S=83.5±12.0 pg/mL, n=3; 7 d LPS(+), Vehicle=54.7±12.3 pg/mL, n=3, MWCNT-L=367.9±34.3 pg/mL, n=3, MWCNT-S=477.2±70.0 pg/mL, n=3)。

IL-1 $\alpha$ の分泌は、MWCNT-S 暴露 3 d において、溶媒群と MWCNT-L 群に対して有意に上昇した (3 d, Vehicle=67.9±9.3×10<sup>-2</sup> pg/mL, n=4, MWCNT-L=57.6±9.7×10<sup>-2</sup> pg/mL, n=4, MWCNT-S=268.2±2.23×10<sup>-2</sup> pg/mL, n=4)。

### D. 考察

MWCNT の暴露による AM の細胞死機構は、caspase-3/7 活性測定と Annexin V/PI 染色の結果からアポトーシスではないことが推測された。しかし、MWCNT 暴露により IL-1 $\beta$ 分泌が増加したことから、インフラマソーム形成を伴うパイロトーシスであることが示唆された。一方、IL-1 $\alpha$ は、炎症性サイトカインの一種であるが、細胞からの分泌に必要なシグナルペプチド配列を持たないため、ネクローシスを起こした細胞から受動的に分泌されることが知られている。本実験では、MWCNT 暴露による AM からの IL-1 $\alpha$ 分泌の増加は確認されなかった。

これまでに、MWCNT-L の方が MWCNT-S よりも早期に AM への細胞障害が現れることを示しているため、MWCNT の毒性は形状によって異なることが

明らかとなっている。つまり MWCNT-L の方が、MWCNT-S よりも人体への毒性が高いと考えられる。しかし、本研究では、MWCNT-S においても暴露時間を長くすることで細胞障害が生じた上に、IL-1 $\beta$ の分泌は MWCNT-L と同程度であった。そのため、他の形状を有する MWCNT の細胞障害についても解析することで、細胞障害が最も抑えられ、安全性が高い形状を解明できると考えられる。

### E. 結論

本研究により、MWCNT 暴露における AM の細胞死機構は、アポトーシスではなくパイロトーシスであることが示唆された。肺内に吸入された MWCNT は、AM に貪食され、AM にパイロトーシスを誘導する。パイロトーシスを起こした AM からは、IL-1 $\beta$ などが放出され、さらなる炎症反応を引き起こす。したがって、肺において慢性的な炎症が起き、活性酸素種による DNA 障害や中皮細胞の増殖亢進を引き起こすことで、中皮腫が発生することが考えられる。

### F. 健康危機情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし。

#### 2. 学会発表

- 1) Sayuri Noda, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi. LRRC26 is functional as an Auxiliary subunit of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel and regulates BK channel activity in bronchial smooth muscle cells. Experimental Biology 2018, Apr. 22, 2018 (San Diego, USA).
- 2) 澤井優輝、鈴木良明、今泉祐治、山村寿男。マクロファージにおいてカベオリン 1 は ATP シグナルを制御する。第 64 回日本薬学会東海支部大会、2018 年 6 月 30 日 (名古屋)。
- 3) Sayuri Noda, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura,

Yuji Imaizumi. Essential roles of the auxiliary  $\gamma$ -subunit of large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in bronchial smooth muscle cells. The 49th NIPS International Symposium Ion channels: looking back, seeing ahead. Dec. 5-8, 2018 (Okazaki).

- 4) Yuuki Sawai, Yoshiaki Suzuki, Yuji Imaizumi, Hisao Yamamura. Caveolin-1 regulates ATP signaling in macrophages. Nagoya Immunology Network in NCU the first international symposium. Mar. 11, 2019 (Nagoya).

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。