

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

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 生化学部 主任研究官

## 研究要旨

インフラマソームは慢性炎症との関連が注目されている。これまで各種の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）や酸化チタンナノマテリアルがマクロファージの NLRP3 インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインを産生する応答を明らかにしてきた。さらに MWCNT-7 曝露による IL-1 $\beta$  産生を顕著に抑制する化合物 X を見いだしている。本研究では、化合物 X を用いて、各種ナノマテリアルによるインフラマソーム活性化の機構の解明を試みる。ATP 刺激による IL-1 $\beta$  産生は化合物 X により抑制されず、本化合物は MWCNT-7 によるインフラマソーム活性化の過程を抑制する機序が示唆された。様々なサイズや形状の酸化チタンナノマテリアル曝露による IL-1 $\beta$  産生については、より減弱した抑制効果を示したことから、本化合物による抑制には、ナノマテリアルの物性による差異があることが示された。

## A. 研究目的

曝露されたナノマテリアルが体内に入ると、マクロファージ等の食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が、近年の研究から、インフラマソームが内外の危険シグナルによる炎症応答の中核を担い、様々な慢性炎症疾患の進展に大きく関わるということが明らかにされている。

本分担研究者はこれまで、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（MWCNT）やチタン酸カリウム、あるいは粒子状の酸化チタンをマクロファージに曝露すると、NLR pyrin domain containing 3（NLRP3）インフラマソームの活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  を強力に産生する応答を見いだしている。引き続き、分泌された IL-1 $\beta$  はオートクライン機構により TNF $\alpha$  産生を誘導し、インフラマソーム活性化は炎症応答カスケードの上流に位置づけられることを明らかにしている。

本研究では、MWCNT 曝露による食食系細胞内でのインフラマソーム活性化を抑制する化合物を用い、各種ナノマテリアルの物性の違いによる抑制応答の差異を明らかにし、メカニズム解明により、慢性影響の *in vitro* 評価の基盤とする。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料および試薬

本研究では多層カーボンナノチューブ MWCNT-7、チタン酸カリウム（針状、長さ 10-20 $\mu$ m、径 300-600nm）、下記四種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（ルチル、粒子径：15 nm）

酸化チタン B（ルチル、粒子径：35 nm）

酸化チタン C（アナテース、粒子径：6 nm）

酸化チタン F（針状ルチル、平均長さ 1.6 $\mu$ m、径 130nm）

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。

## 2. 各種ナノマテリアルの分散

MWCNT-7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。酸化チタンはPBSに50mg/mLの濃度で懸濁し、3~4分間バス型超音波発生装置で処理、vortex、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。

## 3. 細胞処理およびIL-1 $\beta$ 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  $\mu$ 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を除いた培地中で候補薬物の存在下・非存在下で24時間培養したのちに、各種ナノマテリアルあるいはATP、対照となる溶剤を無血清培地に添加し6時間培養した。最終Tween濃度は0.001%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. インフラマソーム活性化を抑制する薬物

これまでの研究において、MWCNT-7をTHP-1マクロファージに暴露すると、NLRP3インフラマソームを介するIL-1 $\beta$ 産生が強力に誘導されることを、NLRP3ノックダウンやcaspase-1阻害により明らかにしている。さらにこの応答の抑制作用を示す化合物の探索を行い、10  $\mu$ Mを24時間前処理することにより、IL-1 $\beta$ 分泌が無処理細胞に比較し20%まで顕著に抑制される化合物Xを見いだしている。

細胞外ATPはインフラマソームを直接活性化することが知られている。ATP(3mM)刺激によるIL-1 $\beta$ 分泌については、化合物X処理により促進された。したがって、化合物Xはインフラマソームおよび下流のcaspase-1によるIL-1 $\beta$ プロセッシング機構には影響せず、MWCNT-7によるインフラマソーム活性化過程に影響することが推定される。他化合物の効果を調べると、化合物A処理ではMWCNT-7によるIL-1 $\beta$ 分泌は逆に促進され、他の四種の化合物に

ついて影響は認められなかった。

### 2. 酸化チタンナノマテリアルによるIL-1 $\beta$ 産生への化合物Xの影響

三種類の粒状酸化チタンナノマテリアル(粒径6、15、35 nm)をTHP-1マクロファージに50または100  $\mu$ g/mLの濃度で暴露し、培地へのIL-1 $\beta$ 産生分泌に対する化合物X(10  $\mu$ M)前処理の影響を調べた。MWCNT-7刺激の場合と異なり、化合物Xの抑制効果は、粒子径が6nmと最小のCでは約20%、AおよびBでは約40%であった(表1)。針状の形状を有する酸化チタンFあるいは針状チタン酸カリウムを暴露したところ、酸化チタンFの場合の抑制効果は約30%、針状チタン酸カリウムの場合には約50%であった。

## D. 考察

NLRP3インフラマソーム活性化を介する炎症応答は、様々な慢性炎症疾患の進展に重要な役割を持つことが明らかにされている。これまでの研究により、多様なMWCNTや酸化チタンナノマテリアル、チタン酸カリウムをマクロファージに暴露すると、NLRP3インフラマソームを介するIL-1 $\beta$ 産生が顕著に誘導されることを明らかにしている。特にMWCNT-7は強力なNLRP3インフラマソーム活性化を示すことから、この応答を抑制する化合物の探索を行い、10  $\mu$ Mの濃度でIL-1 $\beta$ 産生を約80%抑制する化合物Xを見いだしている。

化合物Xは、ATP刺激によるIL-1 $\beta$ 産生には影響しないことが判明した。細胞外のATPはP2X受容体刺激を介して細胞からK<sup>+</sup>を流出させ、NLRP3インフラマソームを直接活性化することが知られている。したがって、化合物Xはインフラマソームおよび下流のcaspase-1活性化には影響せず、MWCNT-7暴露によるインフラマソーム活性化のプロセスを抑制する機構が推定される。

引き続き様々な酸化チタンナノマテリアルをマクロファージに暴露し、IL-1 $\beta$ 産生に対する化合物X前処理の影響を調べたところ、いずれの場合も、抑制効果は

MWCNT-7 に比較して顕著ではなかった。特に、最小の酸化チタン粒子 C (粒子径 6nm) の場合には、抑制効果はわずか 20%であった。粒子径が増大すると効果はやや増加する傾向があったが、針状で平均長 1.6 $\mu$ m の酸化チタン F の場合にも抑制効果はわずか 30%であった。したがって、ナノマテリアルの物理化学的な性質が化合物 X の効果に影響している可能性が考えられる。一方、これまでの研究において、食食阻害剤サイトカラシン D による IL-1 $\beta$  産生の抑制効果は、酸化チタンナノマテリアル粒子径や形状により大きく影響されることを見いだしており、化合物 X の作用点は異なることが示唆される (表 1)。次年度においては、様々な大きさの MWCNT について、化合物 X の効果を比較することを予定している。

#### E. 結論

MWCNT-7 暴露によるマクロファージからの IL-1 $\beta$  産生を顕著に抑制する化合物 X を用い、様々な形状や大きさの酸化チタンナノマテリアルへの効果を調べた。ナノマテリアルの物性の違いにより化合物 X による抑制効果が異なることを見いだした。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

表1 各種酸化チタンナノマテリアル、チタン酸カリウム暴露によるIL-1 $\beta$ 産生に対する cytochalasin Dならびに化合物Xの効果

	酸化チタンC 6-ANA	酸化チタンA 15-RUT	酸化チタンB 35-RUT	酸化チタンF 針状ルチル	針状チタン酸 カリウム
Length				1.6 $\mu\text{m}$	10-20 $\mu\text{m}$
Diameter	6 nm	15 nm	35 nm	130 nm	300-600 nm
IL-1 $\beta$ 産生	++	++	+++(+)	++++	+++
Cytochalasin D (0.2 $\mu\text{M}$ )作用	促進	無影響	無影響	阻害	阻害
化合物X 抑制 効果	20%	40%	40%	30%	50%

