

令和元年度 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 β 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。今年度は各種 MWCNT 類による IL-1 β 産生への化合物 X の影響を解析したところ、MWCNT の大きさにより抑制効果が異なることが判明し、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

ナノマテリアルが体内に入ると、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が、マクロファージの NLR pyrin domain containing 3（NLRP3）インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 β を強力に産生する応答を見いだしている。

本研究では、MWCNT-7 曝露によるマクロファージからの IL-1 β 産生を顕著に抑制する化合物 X について、各種ナノマテリアルの物性の違いによる化合物 X の抑制応答の差異を明らかにする。さらにメカニズム

解明により、慢性影響の *in vitro* 評価の基盤とすることを目的とする。昨年は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の違いを明らかにした。今年度は、各種 MWCNT の物性の違いによる化合物 X の効果を解析する。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では下記四種の多層カーボンナノチューブ MWCNT を用いた。

MWCNT-A（長さ：0.5-2 μm 、径：40-70nm）

MWCNT-B（長さ：0.5-10 μm 、径：85-200nm）

MWCNT-C（平均長：4.51 μm 、径：150 nm）

MWCNT-D（長さ：10-100 μm 、径：20-100nm）

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

各種 MWCNT は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、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. 細胞処理および IL-1 β 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 MWCNT 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. 各種 MWCNT による IL-1 β 産生への化合物 X の影響

長さや径の異なる四種類の MWCNT-A, B, C, D を THP-1 マクロファージに 10 μ g/mL の濃度で暴露し、培地への IL-1 β 産生分泌に対する化合物 X (10 μ M) 前処理の影響を調べた。化合物 X の抑制効果は、最小の MWCNT-A (長さ: 0.5-2 μ m、径: 40-70 nm) では約 30%、一方、より長いものを含む MWCNT-B (0.5-10 μ m) および MWCNT-C (平均長 4.51 μ m) ではそれぞれ 76%、75%であった (表 1)。最長の MWCNT-D (10-100 μ m) による IL-1 β 産生は 84%まで抑制された。

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。これまでの研究において、大きさの異なる各種 MWCNT はマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソーム活性化を介する強力な IL-1 β 産生をもたらすことを明らかにしてきた。

今年度は四種の MWCNT について化合物 X による抑制の効果を解析したところ、

MWCNT の長さにより抑制効果が異なることが判明した。MWCNT-A (長さ: 0.5-2 μ m) による IL-1 β 産生は 30%しか抑制されないのに対し、より長いものが含まれる MWCNT-B, C, D による産生は 75-84%とより顕著に抑制され、MWCNT が長いほどより強力な抑制効果が観察された。昨年度検討した粒状の酸化チタンナノマテリアルの場合にも、粒子径が小さいほど抑制が弱い傾向が観察されている。針状であっても酸化チタン F (平均長 1.6 μ m) の場合には抑制効果は 30%であった。したがって、化合物 X が強力な効果を発揮するためには、酸化チタン、MWCNT のいずれの場合にも、2 μ m 以上の長さが必要とされる可能性も考えられる。

昨年度報告したように、化合物 X は、NLRP3 インフラマソームを直接活性化する細胞外 ATP 刺激による IL-1 β 産生には影響しない。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、一定以上の長さの MWCNT 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。そこで MWCNT を認識する受容体の役割の解析を開始しており、インフラマソーム活性化に至るプロセスへの受容体の関与と化合物 X による影響を解析する予定である。

E. 結論

大きさの異なる各種 MWCNT 暴露によるマクロファージからの IL-1 β 産生について、MWCNT の長さにより化合物 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

(学会発表)

Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A: Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 β secretion via inflammasome activation (EUROTOX 2019) (September 2019 Helsinki, Finland)

表1 各種MWCNT暴露によるIL-1 β 産生に対する
化合物Xの抑制効果

	MWCNT-A	MWCNT-B	MWCNT-C	MWCNT-D
Length	0.5-2 μ m	0.5-10 μ m	Ave: 4.51 μ m	数10~ 数100 μ m
Diameter	40-70 nm	85-200 nm	(150 nm)	20-100 nm
化合物X 抑制	30%	76%	75%	84%