

令和2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：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。さらにこの応答がスタチンにより抑制されること、その効果には各種酸化チタンや MWCNT 類の物性により差異があることを見いだしている。今年度は、このような差異に関わる候補として、細胞のスカベンジャー受容体に着目し検討を行った。スカベンジャー受容体 MSR1 について siRNA によるノックダウンを行い各種 MWCNT 曝露による IL-1 $\beta$ 産生への影響を調べたところ、特定のサイズの MWCNT による産生を軽度抑制する結果を得た。

## A. 研究目的

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事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ナノマテリアルが、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 $\beta$ を強力に産生する応答を明らかにしている。さらに、この応答をスタチンが抑制することを見だし、平成 30 年度および令和元年度の本研究において、スタチンの効果には、各種ナノマテリアルの物性により差異があることを明らかにしている。

今年度はこのような差異に関連する候補として、ナノマテリアルの細胞への取込過程においての関与が予想されるスカベンジャー受容体に着目し、その役割を解析した。

## 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  $\mu\text{m}$ 、径：40-70nm）
- MWCNT-B（長さ：0.5-10  $\mu\text{m}$ 、径：85-200nm）
- MWCNT-C（平均長：4.51  $\mu\text{m}$ 、径：150 nm）
- MWCNT-D（長さ：10-100  $\mu\text{m}$ 、径：20-100nm）

### 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 $\beta$ 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  $\mu\text{M}$  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、さらにスカベンジャー受容体 MSR1 に対する特異的 siRNA (Stealth™ Select RNAi; MSR1) あるいは Stealth RNAi negative control を lipofectamine RNAi MAX 試薬(Invitrogen) を用いて細胞に導入し、24 時間培養した。引き続き各種 MWCNT を無血清培地に添加し 4 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 アッセイキット (ミリポア社) を用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

#### 4. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

MSR1 ノックダウンは mRNA を定量して評価した。細胞から RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。ヒト MSR1、MARCO、および SR-B1 遺伝子に特異的な primer・FAM/ZEN/IBFQ 標識 probe、ならびに QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い ABI Prism 7300 において定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

### **C. 研究結果**

#### 1. 各種 MWCNT による IL-1 $\beta$ 産生への MSR1 ノックダウンの影響

THP-1 マクロファージを MSR1 に対する特異的 siRNA で 24 時間処理すると、MSR1 mRNA の発現量は negative control siRNA で処理した場合に比較し 94%低下した。この処理により、同じく A 型に属するスカベンジャー受容体 MARCO の mRNA 発現量は 43%低下したが、B 型のスカベンジャー受容体 SR-B1 の mRNA 発現はほとんど影響されなかった。

長さや径の異なる四種類の MWCNT を THP-1 マクロファージに 8 $\mu$ g/mL の濃度で暴露し、培地への IL-1 $\beta$  放出に対する MSR1 siRNA 処理の影響を調べた。長さ: 0.5-2  $\mu$ m、径: 40-70 nm と最小の MWCNT-A、0.5-10  $\mu$ m とより長いものを含む MWCNT-B 刺激による IL-1 $\beta$  産生はほとんど影響されなかった。一方、平均長 4.51  $\mu$ m で

ある MWCNT-C 刺激による IL-1 $\beta$  放出は約 30%、最長の 10-100  $\mu$ m を有する MWCNT-D による IL-1 $\beta$  産生は約 30%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知られている。昨年度までの研究において、大きさの異なる各種 MWCNT は、強力な NLRP3 インフラマソーム活性化を介する IL-1 $\beta$  産生をもたらすこと、さらにスタチンはその応答を抑制するが、その効果は MWCNT の大きさに依存することを報告している。MWCNT-A は長さが 0.5-2  $\mu$ m であり、刺激による IL-1 $\beta$  産生はスタチンにより 30%抑制された。針状酸化チタン F (平均長 1.6  $\mu$ m) の場合も 30%抑制されるのに対し、より長いものが含まれる MWCNT-B、C、D による産生はスタチンにより 75-84%抑制された。

そこで今年度は MWCNT を認識する細胞膜受容体に着目した。A 型のスカベンジャー受容体 MSR1 について siRNA によるノックダウンを行いその役割を解析した。MSR1 ノックダウン (94%) により、平均長 4.51  $\mu$ m を超える MWCNT-C および-D 刺激による IL-1 $\beta$  産生は 30%程度抑制されたのに対し、より短い MWCNT-A および B 刺激の場合はほとんど影響されない結果を得た。

MSR1 siRNA 処理による MSR1 発現低下 (94%) は同じく A 型のスカベンジャー受容体 MARCO 発現低下 (40%) も伴っていた。MARCO はアスベストや MWCNT の細胞への接着や肺胞マクロファージへのシリカ取込への関与が報告されているが、私達はこれまで、MWCNT-C による IL-1 $\beta$  産生は MARCO ノックダウン (97%) に影響されない結果を得ている。したがって、MWCNT-C 刺激下の IL-1 $\beta$  産生の MSR1 siRNA による抑制において MARCO 低下の影響は無いと推定される。

MSR1 発現はスタチンにより約 40%低下することを確認している。しかし MSR1 の 94%ノックダウンによる MWCNT-C 刺激での IL-1 $\beta$  産生の低下

は 30%であり、スタチン作用において MSR1 発現低下の寄与は約 12%程度と推定される。スタチンは MWCNT-C および D 刺激による IL-1 $\beta$ 産生を 70-85%程度抑制する効果を発揮する。したがってこのようなスタチン抑制効果においては、MSR1 発現低下ではなく他のメカニズムの寄与が大きいことが推定される。

## 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 $\beta$ 産生において、スキャベンジャー受容体 MSR1 の役割を解析し、MWCNT の長さにより寄与が異なることを見いだした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T., Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 $\beta$  production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages, *Biochem Pharmacol.*, in press.

### 2. 学会発表

最上(西巻)知子, 崔 紅艷, 曾我慶介, 為広紀正, 安達玲子, 蜂須賀暁子, 広瀬明彦, 近藤一成: 多層カーボンナノチューブによる IL-1 $\beta$ 産生を抑制する化合物の同定. 第 47 回日本毒性学会学術年会, (2020.6.29), ポスター