

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15245

研究課題名(和文)チタン酸ナノシートの免疫毒性

研究課題名(英文)Immunotoxicity of titanate nanosheets

研究代表者

西村 泰光(Nishimura, Yasumitsu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：チタン酸ナノシート(TiNS)は期待のナノ材料であるが、このようなシート状無機材料の毒性影響に関する情報は皆無であった。そこで、ヒト末梢血単核球(PBMC)および単離した細胞の培養を行い、TiNSの免疫毒性影響を解析した。TiNS曝露はアスベストと同程度の強さでカスパーゼ依存性アポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。また誘導は特徴的で、アスベスト曝露のように迅速ではなく、単球においては巨大な空胞形成を観察された。空胞内部にはTiNSが同定され、空胞形成とエンドソームとの関連も示された。研究結果はTiNSの生体影響を示唆する。TiNS毒性の解析は新たな機序を照らす可能性があり期待される。

研究成果の概要(英文)：Titanate nanosheet (TiNS) is promising nano-scale 2D material, but nobody has not ever studied toxicity of such sheet-like inorganic material. The present study examined the toxicological effect of TiNS on immune cells by culturing human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or sorted cell populations with TiNS, TiO<sub>2</sub> particle or asbestos fiber. Exposure to TiNS caused caspase-dependent apoptosis with dose dependency comparable to asbestos, but it was interesting that the apoptosis was observed at day 7 of the culture, but not at day 2, and associated with formation of giant vacuoles in monocytes differently from asbestos. The observation with TEM and SEM followed by energy dispersion x-ray spectrometry identified TiNS on the surface of inner membrane of vacuoles. In addition, fluorescence dextran clarified the relationship between vacuole formation and endosome pathway. Our results suggest that incorporation of TiNS might cause adverse effects on the body.

研究分野：免疫毒性学, 免疫学, 産業衛生

キーワード：ナノ毒性 チタン 産業衛生 免疫 単球 空胞 エンドソーム ヒト

### 1. 研究開始当初の背景

チタン酸化物はセラミックスや複合酸化物等の原料や光触媒材料、或いは食品添加物を含め幅広く利用されている。しかし、近年そのナノ粒子について従来の知見とは異なる毒性が明らかとなり健康影響は危惧されるところにある。IARCは、酸化チタンナノ粒子の吸入曝露によるラットに認められた肺腫瘍を根拠とし、2010年に titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) を2Bに分類変更した。チタン酸ナノシート (TiNS) は1nm程度の数分子からなる厚みと平らな結晶構造を持つ代表的な2Dマテリアルである。緻密で平滑性の高い膜を形成するため、紫外線遮断バリア膜、半導体材料、耐食膜、触媒等としての産業利用が見込まれ研究開発が進められている。TiNSはTiO<sub>2</sub>粒子と同様にチタンと酸素からなる結晶構造を持つが、レピドクロサイド型の結晶構造を持ち、アナターゼ型やルチル型構造を持つ従来のTiO<sub>2</sub>粒子と元素位置が異なる。

### 2. 研究の目的

上記のようにTiNSは将来有望なナノ2Dマテリアルであるが、このようなシート状ナノ無機材料の毒性影響に関する情報は皆無であった。我々はこれまで無機粒子・繊維(シリカ・石綿)の免疫細胞への曝露影響に注目し、その幾つかを明らかにしてきた。そこで、ヒト末梢血単核球(PBMC)および単離した細胞集団を用いてTiNSの免疫毒性影響を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1)TiNSの合成および特性の確認

TiNSは既報に倣い液相合成法により合成された。合成したTiNSのXRD解析およびラマンスペクトル解析を行い、ナノシート特有のピーク位置を示すことを確認した。また、縦横約20x30nmの平らな菱形の形状がTEM像より観察された。Zetasizerの解析からTiNSが水懸濁液中で25.03±1.24nmの粒径を示す一方、培地中では422.13±64.74nmの二次粒径を持つことが分かった。またゼータ電位は-22.10±6.16mVであった。

#### (2)細胞の調整と培養

同意を得た健康人より提供された末梢血からFicoll-Hypaque法にてPBMCを調整した。細胞集団の単離には磁気ビーズを用いた。PBMCまたは単離した細胞を10µg/mlのTiNS曝露下で培養し、石綿 chrysotile asbestos またはTiO<sub>2</sub>粒子曝露群と比較し、各種解析に用いた。一部、汎カスパーゼ阻害剤としてQ-VD-OPhを添加し培養した。細胞培養には、10%FBS含RPMI1640培地を用いた。培養後の細胞の形態変化を光学顕微鏡で観察し、一部では蛍光標識抗体の前処理後に培養し、蛍光顕微鏡(BZ-9000)での観察を行った。

#### (3)アポトーシスの測定

アポトーシス細胞はFITC標識アネキシンV(Anx)と臭化プロピディウム(PI)の二重染

色およびSub-G1細胞集団の出現により確認しFACSCaliburで細胞比率(%)を測定した。(4)電子顕微鏡による細胞内部構造の観察およびチタン元素の同定

細胞を固定、予備包埋後、酸化オスミウムで後固定し、脱水、エポキシ樹脂包埋後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡(TEM, JEM-1400)で解析した。予備包埋細胞をパラフィン包埋した後、切片を作成し、走査型電子顕微鏡(SEM, S-3400N)で空胞内部を解析し、エネルギー分散型X線分析でチタンの有無を確認した。

#### (5)エンドソームの観察

PBMCをカバーガラスボトムチャンバーにて1日培養し接着細胞として単球を得て、3日間の予備培養後Alexa 568標識Dextran(A-Dex)で標識し、TiNSを加え12時間培養し空胞形成とエンドソーム構造を蛍光顕微鏡(BZ-9000)で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)研究の主な成果

TiNSをPBMC培養時に添加曝露すると、TiO<sub>2</sub>ミクロンサイズ粒子曝露時と異なり、培養7日後には空胞が成長し巨大化した細胞が多数観察された。蛍光標識抗体による染色によりTiNS曝露下培養時PBMC中の空胞形成細胞の大部分がCD14<sup>+</sup>単球であることが分かった。他方、石綿曝露時には貪食を試み細胞死に至った収縮した細胞像が観察された。

石綿曝露下培養2日目にはAnx<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>アポトーシス細胞の用量依存的増加が見られたが、TiNS曝露下条件には見られず、培養7日目になるとTiNS曝露時においてもアポトーシス細胞の増加が見られ、その用量依存性は石綿と同程度であった。TiNS曝露後のアポトーシスは、低DNA細胞であるSub-G1集団の増加によっても確認された。また、TiNS曝露によるアポトーシスは貪食能を持つ単球のみならずCD4<sup>+</sup>リンパ球でも確認されたが、前者ではAnx<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>細胞である一方、後者ではAnx<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>細胞であった。Q-VD-POh添加により石綿およびTiNS曝露によるAnx<sup>+</sup>細胞増加は阻害され、TiNS曝露によるアポトーシスのカスパーゼ依存性が確認された。

単球における著明な空胞形成は、細胞内へのTiNSの取り込みを示唆した。そこでPBMCより単離した単球をTiNS曝露下で培養し、培養後の細胞内部の構造を観察した。超薄切片のTEM像は培養1日後から空胞形成を示し、2日後にかけて空胞は増加、増大した。空胞内にはTiNS様の物質が観察され、特に空胞内壁近傍に存在した。TiNS曝露下培養後単球のパラフィン切片SEM像は空胞内部を明瞭に写し、空胞内壁の粗面な領域を示した。エネルギー分散型X線分析(EDX)の結果、その領域からチタンが同定され、即ちTiNSが単球に取り込まれ空胞内部に存在することが明らかとなった。カバーガラス底面上に単球由来接着細胞を分離し、A-Dex添加前培養に

よりエンドソームを可視化し、TiNS 曝露下培養した。TiNS 曝露により形成誘導された多くの空胞が A-Dex との共局在性を示し、TiNS 曝露後の空胞形成とエンドソームとの関わりが確認された。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により TiNS がカスパーゼ依存性アポトーシスを免疫細胞に誘導することが明らかとなった。このアポトーシスは石綿曝露時と同程度の容量依存性を示し、決して無視できない TiNS の生体影響を示唆する。一方、TiNS 曝露が誘導するアポトーシスは緩やかに進行し、特に単球において著明な巨大空胞形成を伴うという特徴は、TiNS の特有な毒性機序の存在を示唆する。実際、TiNS は空胞内近傍に多く存在し、空胞形成におけるエンドソーム機能との関わりも確認され、TiNS 毒性におけるベシクル、エンドリソソーム、オートファゴソームといった細胞内膜系との関わりが示唆される。我々の研究成果は期待の 2D ナノマテリアルである TiNS の毒性影響を初めて世に伝える内容であり、国内外を問わず重要な一知見であると言える。

(3)今後の展望

オートファジーは細胞内膜系が関わるオートファゴソームの形成に始まる細胞内分解機能であり、その機能不全はアポトーシスを引き起こす。オートファジーはオートファゴソームとリソソームとの融合により完了し、従ってエンドリソソーム機能と密接に関連する。また、酸化ストレスなど種々の刺激は lysosome 膜の統合性を崩壊させ、所謂 lysosomal-membrane permeabilization (LMP)を引き起こし、LMP はカスパーゼ依存性アポトーシスを伴う細胞死の誘因と成る。空胞内近傍に位置する TiNS を示す TEM・SEM 像および EDX の知見は、上述の細胞内膜系が関連する細胞死の機序を示唆する。TiNS が持つレピドクロサイド型結晶構造の特徴は毒性機序と関わる可能性があり、金属ナノマテリアルの毒性影響の理解に示唆を与える。巨大な空胞形成を伴う TiNS の毒性は特徴的で、その毒性機序の解析は他のナノ材料には無い機序を明らかにする可能性があり、今後の更なる研究が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Yoshioka D, Nishimura Y, Katsumata K-i. Synthesis and fluorescence properties of lanthanide-supported titanate nanosheets. *Journal of Luminescence*. 2018;194:316-20. doi:10.1016/j.jlumin.2017.10.058 査読有り
- 2) Nishimura Y, D. Yoshioka, N. Kumagai-Takei, S. Lee, H. Matsuzaki, K.

Yoshitome and T. Otsuki. Titanate nanosheets cause caspase-dependent apoptosis of human immune cells with giant vacuole formation through endosomal defect in monocytes. *Toxicol Lett*. 2017;280(Supplement 1):S182-S3. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.512 査読無し

- 3) Yoshioka D, Nishimura Y, Katsumata K-i. Fluorescence Properties of the Lanthanide Supported onto Titanate Nanosheets. *Journal of Environmental Science and Engineering A*. 2017;6(8). doi:10.17265/2162-5298/2017.08.005 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Nanotoxicity of titanium nanosheets for human immune cells, ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland)
- 2) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Apoptosis of monocytes with giant vacuoles related to disruption in endosomal pathway caused by titanate nanosheets, The British Society for Immunology Congress 2017. 2017.12/4-7. Brighton, UK
- 3) 西村泰光. チタン酸ナノシートの免疫毒性から考える金属ナノマテリアルの毒性影響, メタルバイオサイエンス研究会 2017 2017.10-13-14 .岡山国際交流センター, 岡山 (招聘講演)
- 4) Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Titanate nanosheets cause caspase-dependent apoptosis of human immune cells with giant vacuole formation through endosomal defect in monocytes, The 53rd Congress of the European Societies of Toxicology. 2017.9/10-13. Bratislava, Slovak National Theatre
- 5) Nishimura Y. Physical-chemical analysis of titanate nanosheets (TNS) as 2D materials in human immune cells, 1st International Occupational Health Forum & 3rd China-US Occupational Health Symposium, Beijing, 2017.8/22-23 (招聘講演)
- 6) 西村泰光, 吉岡大輔, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 吉留敬, 大槻剛巳. チタン酸ナノシートのヒト免疫細胞への毒性影響, 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017.7/10-12 パシフィコ横浜, 横浜
- 7) 西村泰光, 吉岡大輔, 李順姫, 武井直子,

- 松崎秀紀, 吉留敬, 大槻剛巳 . チタン酸ナノシート曝露によるヒト PBMC の آپトトーシスと単球における巨大空胞形成, 第 90 回日本産業衛生学会 2017.5/11-13 東京ビッグサイト TFT ビル, 東京
- 8) 吉岡大輔, 西村泰光 . ランタノイド担持チタン酸ナノシートの蛍光発光に及ぼすチタン酸ナノシートへの 5 族元素添加の効果, 第 14 回ナノ学会 2016.6/14-16 北九州国際会議場, 北九州
- 9) 西村泰光, 吉岡大輔, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 吉留敬, 大槻剛巳 . 空胞形成を伴う細胞死を惹起するチタン酸ナノシートの単球への取り込みと細胞内動態, 第 86 回日本衛生学会学術総会 . 2016.5/11-13 . 旭川市民文化会館, 旭川
- 10) Nishimura Y, Yoshioka D, Lee S, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Vacuole Formation And Caspase-dependent Apoptosis In Human Monocytes Caused By Exposure To Titanate Nanosheet, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2016.3/13-18, New Orleans, Louisiana, U.S.A .
- 11) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. The characteristic cell death of human monocytes caused by exposure to nano-sized and sheet-like titanate, 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.11/18-20 札幌コンベンションセンター, 札幌
- 12) 西村泰光, 吉岡大輔, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 吉留敬, 大槻剛巳 . チタン酸ナノシート曝露による単球の空胞形成と細胞死, 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会 2015.9/10-11. 京都大学百周年時計台記念館国際交流ホール, 京都

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Toxicity of titanate nanosheets on human immune cells. In. CYTOTOXICITY, ISBN 978-953-51-5869-1, Book edited by: Tülay Askin Celik. IntechOpen Limited, London, UK. 2018 (in press)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :

出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

〔その他〕  
 ホームページ等  
 川崎医科大学衛生学ホームページ  
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
 西村 泰光 (NISHIMURA YASUMITSU)  
 川崎医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号 : 90360271

(2) 研究分担者  
 吉岡 大輔 (YOSHIOKA DAISUKE)  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号 : 40638318

(3) 研究分担者  
 大槻 剛巳 (OTSUKI TAKEMI)  
 川崎医科大学・医学部・教授  
 研究者番号 : 40160551

(4) 研究分担者  
 武井 直子 (KUMAGAI-TAKEI NAOKO)  
 川崎医科大学・医学部・講師  
 研究者番号 : 00509276

(5) 研究分担者  
 松崎 秀紀 (MATSUZAKI HIDENORI)  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号 : 80335463

(6) 研究分担者  
 李 順姫 (LEE SUNI)  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号 : 70414026

(7) 研究分担者  
 吉留 敬 (YOSHITOME KEI)  
 川崎医科大学・医学部・講師  
 研究者番号 : 40304307

(3) 連携研究者  
 ( )

研究者番号 :

(4)研究協力者 ( )