

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590164

研究課題名(和文)カーボンナノチューブによる炎症応答とコレステロールによる制御の機構解明

研究課題名(英文)Control of multiwall carbon nanotube-induced inflammatory responses by cellular cholesterol

研究代表者

最上 知子(Nishimaki-Mogami, Tomoko)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・部長

研究者番号：90174333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブはアスベストと類似した形状を持つことから環境や健康への影響が懸念され、マウスにおいて炎症、中皮腫誘発や動脈硬化促進作用が報告されている。本研究では、多層カーボンナノチューブを暴露したTHP-1マクロファージから炎症性サイトカインIL-1 β の産生が亢進する現象と、コレステロールによる制御のメカニズムを明らかにすることを目的として検討を行った。多層カーボンナノチューブが細胞に取り込まれ、NLRP3インフラマソームを介して成熟型IL-1 β を産生すること、リン脂質を用いた分散により応答が増強されること、スタチンによるIL-1 β 産生応答の抑制とその機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Because carbon nanotubes have asbestos-like shape and size, concerns about their adverse effect on environment and health have been raised. Studies have shown their association with inflammation, mesothelioma, and atherosclerosis progression in mice. In this study, we investigated the mechanism by which multiwall carbon nanotubes (MWCNT)-induced production of an inflammatory cytokine IL-1 β is regulated by cholesterol. We found that MWCNTs were incorporated into THP-1 macrophages and induced IL-1 β maturation via NLRP3 inflammasome activation. This effect is enhanced by dispersion of MWCNTs with lung-surfactant-like phospholipids. Various statins repressed MWCNT-induced IL-1 β release by reducing cellular uptake of MWCNTs.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ナノ材料 カーボンナノチューブ コレステロール インフラマソーム IL-1 NLRP3

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブなどのナノマテリアルは技術革新を担う新材料として生産量が急増しているが、環境や生体への影響は多くが未知である。多層カーボンナノチューブは形状や大きさが肺に中皮腫を誘発するアスベストに類似していることから安全性が注目され、マウスの腹腔に投与すると炎症と腫瘍を誘発することが報告されている。また心血管疾患とナノサイズの環境中微粒子には相関があり、マウスに気管内投与すると単層カーボンナノチューブが動脈硬化を促進することが知られている。

多層カーボンナノチューブは水溶液中では凝集性が高い。研究代表者らは、肺サーファクタント脂質成分類似のリン脂質を用いて分散し、多層カーボンナノチューブがマクロファージに貪食されると炎症性サイトカイン IL-1 の産生を促進することを見出した。IL-1 は免疫・炎症を制御する重要な因子として位置づけられており、感染やストレスに応じて産生される。近年、マクロファージが微細なコレステロール結晶を貪食すると IL-1 産生が亢進し、動脈硬化進展に関わることが明らかにされた。カーボンナノチューブとコレステロールは共通した応答を誘導することから相互作用の可能性に着目して解析を開始し、カーボンナノチューブによる IL-1 産生は、HMG-CoA 還元酵素阻害剤スタチンで細胞内コレステロール量を低下すると著しく抑制される予備的知見を得た。

IL-1 は、病原体や異物をインフラマソームと呼ばれる病原体センサー複合体が認識してカスパーゼ-1 を自己活性化し、前駆体を切断して産生されることが知られる。NOD 様受容体(NRL)などインフラマソーム構成因子や IL-1 前駆体の遺伝子転写が促進されれば、IL-1 産生が増強されることになる。また細胞膜のコレステロールは膜機能維持に重要な役割を持っている。膜トランスポーター ABCA1 はコレステロールを細胞外に輸送して HDL を形成する主要な機能に加え、膜のコレステロール環境維持にも働き、発現低下は膜のラフト構造を変化させ、TLR4 炎症応答シグナルの増強やエキソサイトーシス低下を招くことが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、多層カーボンナノチューブが IL-1 産生を促進する現象とコレステロールによる制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。多層カーボンナノチューブによる IL-1 産生応答について、リン脂質を用いたカーボンナノチューブの分散の影響、インフラマソームの役割を解析し、コレステロールが炎症応答を制御するメカニズムについて、(i)インフラマソーム構成因子あるいは IL-1 前駆体の発現制御、(ii)コレステロール生合成中間体の関与に着目して解析した。

3. 研究の方法

THP-1 細胞を PMA でマクロファージ様に分化し、多層カーボンナノチューブをリン脂質あるいは低濃度の Tween 20 に懸濁して分散して暴露した。培地に放出される IL-1 は Milliplex アッセイあるいは Western blot により測定した。また多層カーボンナノチューブの細胞への取り込みは、フローサイトメトリーを用いて側方散乱光 (SSC) の増加により測定した。

4. 研究成果

(1) リン脂質による多層カーボンナノチューブ分散の効果

肺サーファクタントの主要脂質成分であるホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルグリセロール (PG) 混合物が人口肺サーファクタント作用を示す報告があることから、この混合物を用いて多層カーボンナノチューブを分散し、効果を調べた。分化 THP-1 細胞に暴露したところ、PC/PG による分散は、PBS (0.002% Tween 20 含有) で分散した場合に比較して培地への IL-1 分泌が顕著に増加した。カーボンナノチューブ表面に PC/PG が付加すると、酸性リン脂質である PG のマイナス荷電によりスキャベンジャー受容体を介する細胞への取り込みが増加した可能性が推定された。しかしながら、多層カーボンナノチューブの細胞への取り込みをフローサイトメトリーを用いて SSC の増加により測定したところ、PC/PG による分散は取り込み量に影響を与えないことが判明した。また PC のみで分散した場合でも PC/PG (3:1) と同程度の IL-1 産生増強効果を示した。一方、PG の代わりに同じく酸性リン脂質であるホスファチジルセリン (PS) を使用した場合には、PC/PS (3:1) 混合物単独でもカーボンナノチューブの効果に匹敵する IL-1 放出作用を示し、分散剤としては不適であった。

(2) 多層カーボンナノチューブによる IL-1 産生の機序

THP-1 細胞を多層カーボンナノチューブに暴露すると、フローサイトメトリーにおける側方散乱光 SSC が増加し、その増加は貪食阻害剤サイトカラシン D で抑制された。また IL-1 放出の誘導もサイトカラシン D でほぼ完全に抑制されたことから、多層カーボンナノチューブは貪食により細胞に取り込まれ、IL-1 産生を誘導することが判明した。

多層カーボンナノチューブ暴露による IL-1 放出に伴い、細胞内では IL-1 前駆体の切断とともに活性型 caspase-1 の放出が増加した。また IL-1 産生は caspase-1 阻害剤により抑制された。近年の研究により、Nod 様受容体 NLRP3 を含むインフラマソーム複合体が IL-1 産生のシグナルを認識して

caspase-1 を自己活性化し、IL-1 前駆体を切断すること、また NLRP3 は細胞外へのカリウム流出により活性化し、培地への高濃度カリウム添加により抑制されることが知られている。本研究においても、多層カーボンナノチューブ暴露による IL-1 放出は、高濃度カリウム添加により抑制され、また siRNA で NLRP3 をノックダウンすることによっても抑制された。したがって、多層カーボンナノチューブは細胞に取り込まれ、NLRP3 を含むインフラマソームにより認識されて caspase-1 が自己活性化され、成熟型 IL-1 の産生が促進される機序が明らかになった。

(3) コレステロールによる IL-1 産生応答の制御

コレステロール生合成の律速酵素 HMG-CoA 還元酵素の阻害薬であるスタチンや細胞からコレステロールを引き出し低下させるシクロデキストリンで THP-1 細胞を前処理すると、多層カーボンナノチューブによる IL-1 産生が顕著に抑制されることが判明した。スタチンの効果は濃度に依存しており、各種スタチンは compactin を除きいずれも顕著な効果を示した。

スタチンは NLRP3 および IL-1 の mRNA 発現量には大きく影響しなかった。また、ATP による IL-1 産生誘導はスタチン処理によりむしろ増加した。培地に添加した ATP は P2X7 受容体を介して細胞からのカリウム流出を促進し、NLRP3 を直接活性化して IL-1 分泌を促進する機序が知られている。したがって、スタチンは NLRP3 の上流、すなわちカーボンナノチューブにより NLRP3 が活性化に至るまでのプロセスを抑制することが推定された。

多層カーボンナノチューブの THP-1 細胞への取りこみを、フローサイトメトリーを用いて側方散乱光 SSC の測定により評価したところ、取りこみはスタチン処理により有意に低下することが判明した。

一方、コレステロール合成経路の下流に位置するスクアレン合成酵素の阻害剤 YM053601 は多層カーボンナノチューブによる IL-1 放出に全く影響せず、ゲラニルゲラニルピロリン酸を補給するとスタチンによる IL-1 産生抑制は解除された。したがって、スタチンは細胞のコレステロールレベルではなく、メバロン酸経路の代謝物の量を低下して効果を発揮していると推定された。すなわち、多層カーボンナノチューブによる IL-1 産生誘導には何らかのゲラニルゲラニル化タンパクが関与しており、スタチンはその修飾を抑制することが推定された。したがって、当初計画していた ABCA1 を欠損させて膜コレステロール環境を変える実験は中止した。

以上の結果から、スタチンはタンパクのゲラニルゲラニル化の抑制を介して多層カー

ボンナノチューブのマクロファージへの取りこみを低下させ、結果として NLRP3 を介する IL-1 プロセッシングが抑制される機序が推定された。

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 1 件)

Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha Increases Liver-specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to ApoA-I in Response to Cholesterol Depletion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, (2012) 1005-1014 査読有

[学会発表](計 6 件)

最上(西巻)知子, 崔 紅艶, 岩崎 香里, 奥平 桂一郎, 内藤 幹彦, 鈴木 和博, 広瀬 明彦
多層カーボンナノチューブは NLRP3 活性化を介して IL-1 産生を促進する. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11 (横浜)

最上(西巻)知子, 崔 紅艶, 岩崎 香里, 奥平 桂一郎, 内藤 幹彦, 鈴木 和博, 広瀬 明彦
多層カーボンナノチューブによる IL-1 産生促進とその機構. フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー 2011.10.28(金沢)

最上(西巻)知子
HDL 産生トランスポーター ABCA1 のコレステロールによる肝型転写制御 - ミニシンポジウム「脂質ホメオスタシス: その破綻と疾患」第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム(招待講演) 2011.6.17 (富山)

Nishimaki-Mogami T, Cui H, Okuhira K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Hirose A. Mechanism underlying multiwall carbon nanotube-induced IL-1beta secretion. *EUROTOX 2012* 2012年06月19日 (Stockholm, Sweden)

Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha(HNF4alpha) Regulates Liver-specific Human ATP-binding Cassette Protein A1 (ABCA1) Gene Expression in Response to Cholesterol Depletion, ASBMB Symposium "Frontiers in Lipid Biology" 2012年09月05日 (Banff,

Canada)

Nishimaki-Mogami T, Cui H, Wu W,
Okuhira K, Naito M, Nishimura T, Sakamoto
Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D,
Miyazawa K, Hirose A

High-temperature calcined fullerene
nanowhiskers and multi-wall carbon
nanotubes have abilities to induce
IL-1beta secretion through
NLRP3-dependent mechanism, depending on
their lengths Eurotox2013 2013年9月
3日 (Interlaken, Switzerland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

最上 知子 (NISHIMAKI-MOGAMI, Tomoko)
国立医薬品食品衛生研究所・
代謝生化学部・部長
研究者番号：9 0 1 7 4 3 3 3

(2) 研究分担者

奥平 桂一郎 (OKUHIRA, Keiichiro)
国立医薬品食品衛生研究所・
機能生化学部・室長
研究者番号：1 0 4 2 5 6 7 1