

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590868

研究課題名(和文) ナノマテリアル・ナノ粒子のアクシデンタルな曝露による生体影響

研究課題名(英文) Effects of exposure to nanomaterials or nanoparticles on human health

研究代表者

菅野 さな枝 (Kanno, Sanae)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：50391090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：昨今、ナノ粒子やナノマテリアルの開発が急速に進み、アクシデンタルな曝露や日常的に体内に取り込む可能性がある。繊維状ナノマテリアル(アスベストやカーボンナノチューブなど)の吸入曝露が炎症反応を通して肺に疾患を引き起こすことが知られている。ナノマテリアル等の曝露による肺疾患に關与する炎症反応であるNLRP3インフラマソーム機構に、GTP effectorであるROCKsが關与することを細胞を用いて明らかとした。アクシデンタルな曝露による生体影響の一部を明らかにすることができた。これらの毒性発現機序の解明の結果は、今後の繊維状粒子の曝露時の治療や発症遅延にも貢献する貴重なデータであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Long fibers, such as asbestos and carbon nanotubes (CNTs), are more potent activators of inflammatory and genotoxicity than short or tangled fibers. Fibrous particles trigger interleukin-1beta secretion and cause inflammatory diseases through NLRP3 inflammasomes in phagocytotic cells. This study clarified that GTPase effector Rho-kinases (ROCK1, and 2) are involved in inflammasome responses induced by fibrous particle, such as asbestos, CNTs and monosodium urate in THP-1 cells. Though further study is required to elucidate the function of ROCKs on NLRP3 inflammasomes activated by fibrous particles, present findings suggest that ROCKs inhibitor might directly or indirectly abrogate NLRP3 inflammasomes, leading to several autoinflammatory diseases triggered by fibrous particles. I examined To clarified the mechanism of NLRP3 inflammasomes induced by fibrous particles.

研究分野：毒性学

キーワード：NLRP3 inflammasome Rho-kinases Interleukin 1beta THP-1 cells Fibrous particles

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 昨今、ナノ粒子やナノマテリアルの開発が急速に進み、デオドラントスプレーや化粧品から半導体などの工業製品まで広い範囲で使用されつつある。昨今、ナノ粒子およびナノマテリアルが広い範囲で用いられつつある。ナノ粒子のアクセシブルな曝露による被害の報告が世界各国でされた。中国ではナノ粒子塗料のスプレー作業により死亡者が出て、各国メディアが大きく報道した。我々が使用する機会がさらに増え、アクセシブルな曝露や日常的な体内への取り込みが、今後増える可能性が考えられる。
- (2) ナノ粒子は大きな粒子に比べて毒性が高いことが示唆されている。それにもかかわらず、既存のナノ粒子・ナノマテリアルのガイドラインは化学物質を対象として作製されており、同素体やサイズの規定はない。つまり、その安全性が確保されずに利用されているのが現状である。
- (3) ナノテクと呼ばれる時代になり、新時代の新素材・新形状の早急な毒性評価が望まれている。

## 2. 研究の目的

- (1) 今後さらにナノ粒子・ナノマテリアルが量産され、アクセシブルな曝露や日常的に体内に取り込む可能性もある。しかし、その一方で健康影響については明確になっていない。
- (2) 本研究では、これらナノ粒子・ナノマテリアルの細胞による認識機構及び疾患との関連を明らかにすることにより、新素材曝露による生体への毒性学的影響を検討する。法中毒分野においても、今後起こり得る曝露の可能性のある新素材の毒性の解明が、曝露時の治療や対策のために必須であると考え研究を行う。
- (3) アクシデンタルにナノ粒子やナノマテリアルを吸入曝露した場合には、大きい粒

子と比較すると多くの割合で、肺の深部の沈着しやすいことが知られている。肺深部の沈着した粒子は、マクロファージに貪食され、生体内に取り込まれることとなる。そこで、今回の研究は、これらの毒性を考える上でもとても重要であると考えられるマクロファージへの影響を調べることを目的とした。

- (4) アスベストやシリカなどの繊維状の汚染物質の吸入が、肺疾患に関係することが知られている。最近の報告で、これらの繊維状物質による、肺疾患に関連する炎症誘発の機構として、細胞質にある NLRP3 インフラマソームと呼ばれるたんぱく質複合体が関与することが明らかとなった。これは、微小な繊維状物質が細胞に貪食されると、病原体などと同様に、Nalp3 インフラマソームを介し caspase-1 が活性化され、最終的に炎症性サイトカインであるインターロイキン-1beta (IL-1 beta) 産生を引き起こす機構である。本研究では繊維状ナノマテリアルとして、アスベスト、及び形状がアスベストと似ており工業用に広い範囲で使用され始めているカーボンナノチューブ (CNT)を用いた。繊維状ナノマテリアルによる NLRP3 インフラマソーム誘導の機構をさらに詳細に明らかにすることを目的として実験を行った。Human monocytesへのこれらの曝露による IL-1 beta 産生に、細胞骨格に関わる GTPase effector である Rho-kinases (ROCK1, 2) が関与するか否かを、阻害剤及び Knockdown 実験により調べた。
- (5) アスベストの代替品として建築資材に用いられている繊維状ナノマテリアルの一つであるロックウール (man-made vitreous fibers 10)が、インフラマソームを誘導するかわりを検討した。
- (6) NLRP3 インフラマソームへの ROCKs

の関与が、株化された細胞だけでなく、ヒト白血球由来マクロファージでも見られるか否か、検証を行った。

### 3. 研究の方法

(1) ナノマテリアルのマクロファージでの影響を Human monocytes (THP-1)を用いて行った。THP-1 細胞に phorbol myristate acetate (PMA)を添加しマクロファージ様に分化させた細胞を用いた。阻害実験は、Y27632 (ROCKs 阻害剤)又は Z-YVAD (caspase-1 阻害剤)存在下でアスベスト、CNT 又は陽性対照として lipopolysaccharide (LPS)を暴露し、培養液中に分泌された IL-1 beta を ELISA にて定量した。また、ROCK1, 2 の各 siRNA を遺伝子導入した細胞に同様の暴露を行い IL-1 beta を定量した。細胞に接着又は取り込まれたアスベスト及び CNT 量は、比濁法にて定量した。ライソゾームの損傷は培養液に流出した cathepsin B を Western blotting にて検出することにより調べた。

(2) THP-1 を用いてロックウール (man-made vitreous fibers 10) 曝露後の細胞毒性、及び caspase-1 阻害剤存在下又は非存在下での IL-1 beta 分泌量を ELISA にて定量した。また、ヒト白血球由来マクロファージに、ROCKs 阻害剤存在下又は非存在下で CNT 又は陽性対照として nigericin を曝露し、IL-1 beta 分泌への ROCKs 阻害剤の効果を調べた。

### 4. 研究成果

(1) アスベスト、CNT 及び LPS の暴露により引き起こされた IL-1 beta 産生は、Z-YVAD により抑制されたことより、IL-1 beta 産生には caspase-1 が関与していることが示唆された。また、Y27632 による阻害実験 (Fig. 1) 及び siRNA 実験 (Fig. 2) により ROCKs の発現量を抑

えた結果、アスベスト及び CNT による IL-1 beta 産生は抑制された。一方、これらの実験では LPS による IL-1 beta 産生は変化しなかった。THP-1 に接着又は取り込まれたアスベスト及び CNT の量は、暴露により増加したが、ROCKs 阻害剤である Y27632 によっては変化しなかった。また、培養液中に分泌した活性型 cathepsin B の量はアスベスト及び CNT 暴露により増加したが、LPS によっては変化が見られなかった。

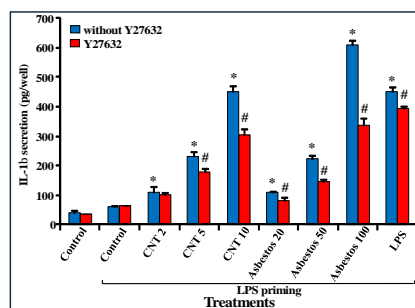


Fig. 1 Effects of ROCK inhibitor on CNT, asbestos- or LPS-induced IL-1b secretion in THP-1 cells.

Cells were cultured with 100 nM PMA for 24 hrs in a 96-well culture dish. For priming, the cells were incubated with 10 ng/mL LPS for the last 3 hrs of differentiation with PMA. The cells were washed with HBSS and exposed to 2-10 mg/mL CNT, 20-100 mg/mL asbestos or 0.1 mg/mL LPS in the presence or absence of Y27632, a ROCKs inhibitor, for 12 hrs. IL-1b secretion in culture supernatant of cells were measured by ELISA. #*p* < 0.05, compared to without Y27632; \**p* < 0.05, compared to control of priming.

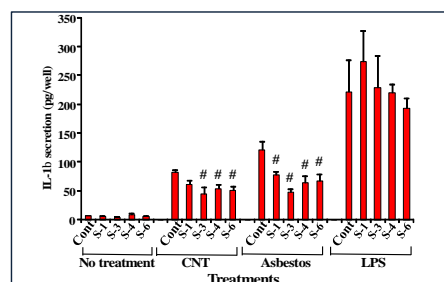


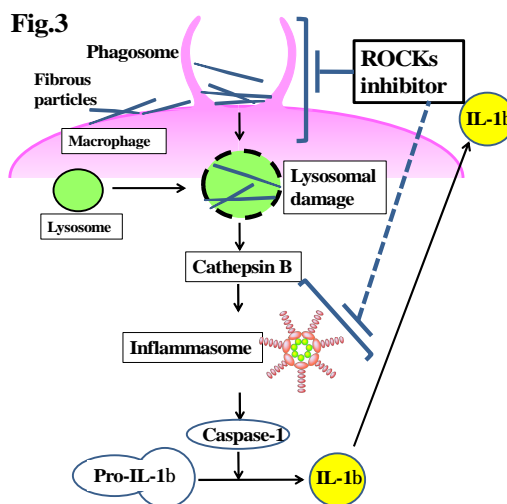
Fig.2 Effects of ROCK1 and ROCK2 siRNA on IL-1b secretion in THP-1 cells treated with CNT, asbestos or LPS.

Cells were cultured in the presence of 100 nM PMA for 24 hrs in a 96-well culture dish. The differentiated cells were washed with HBSS and transfected with 2 independent antisense of each ROCK1 (S1 and 3) and ROCK2 (S4 and 6) siRNA or control siRNA (cont) for 48 hrs. After transfection, the cells were further cultured in fresh RPMI1640 complete medium with 10 ng/mL CNT, 100 mg/mL asbestos or 0.1 mg/mL LPS for 12 hrs. IL-1b secretion in culture supernatant of cells were measured by ELISA. #*p* < 0.05, compared to each treatment.

(2) ロックウール 0-1000 µg/mL 曝露 72 時間では細胞毒性は見られなかった。IL-1 beta 分泌量はロックウールの濃度依存的に増加し、caspase-1 阻害剤にて抑制された。しかし、その分泌量はアスベストや CNT に比べ顕著に低いことより、インフ

ラマソームを介した IL-1 beta 分泌誘導能は低いことが示唆された。

CNT 誘導 IL-1 beta 分泌量の ROCKs 阻害剤による抑制は、THP-1 のみならずヒト単球由来マクロファージにおいても観察されたことより、ROCKs が繊維状ナノマテリアルによる IL-1 beta 産生機構に関与していることが明らかとなった。本研究にて明らかとなった結果の模式図を Fig. 3 に示す。



## 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 2 件)

S. Kanno, S. Hirano, S. Chiba, H. Takeshita, T. Nagai, M. Takada, K. Sakamoto, T. Mukai: The role of Rho-kinases in IL-1 beta release through phagocytosis of fibrous particles in human monocytes. Arch. Toxicol., 89, 73-85, 2015.

doi:10.1007/s00204-014-1238-2. 査読あり

S. Kanno, S. Hirano, M. Sagi, S. Chiba, H. Takeshita, T. Ikawa, K. Ichiba, T. Nagai, M. Takada, K. Sakamoto, T. Mukai: Sulfide induces apoptosis and Rho kinase-dependent cell blebbing in Jurkat cells. Arch. Toxicol., 87, 1245-1256, 2013.

doi:10.1007/s00204-013-1027-3. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

菅野 さな枝、Glen Deloid、Lester Kobzik、平野 靖史郎、千葉 正悦、竹下 裕史、高田 女里、向井 敏二：マクロファージを用いたロックウール曝露による IL-1beta 産生と繊維状粒子による Rho-kinase 依存的 IL-1beta 産生 平成 27 年 6 月 10-12 日 第 99 次日本法医学会高知市文化プラザ カルポート (香川県高松市)

Sanae Kanno, Seishiro Hirano, Shoetsu Chiba, Tomonori Nagai, Hiroshi Takeshita, Meri Takada, Toshiji Mukai: Rho-kinases are involved in caspase-1-mediated IL-1 beta secretion following in vitro exposure to multi-walled carbon nanotubes and asbestos in human monocyte. March 10-14, 2013. The 52<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, TEXAS, USA.

菅野 さな枝、平野 靖史郎、鷲盛久、千葉 正悦、永井 智紀、竹下 裕史、高田 女里、向井 敏二：繊維状粒子を暴露した THP-1 細胞における IL-1beta 産生 平成 25 年 7 月 5-6 日 第 32 年会日本法中毒学会 さわやかちば県民プラザ (千葉県 柏市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 さな枝 (KANNO, Sanae)  
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：50391090

### (2) 連携研究者

平野 靖史郎 (HIRANO, Seishiro)  
 国立環境研究所・室長  
 研究者番号：20150162