

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600031

研究課題名(和文) ナノカーボンによるリソソーム膜障害と毒性発現メカニズム

研究課題名(英文) Lysosome membrane disordering caused by nanocarbons and toxicity mechanism

研究代表者

湯田坂 雅子 (Yudasaka, Masako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・招聘研究員

研究者番号：70159226

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)：ナノカーボン(NC)は体内でマクロファージに取り込まれることが多く、過剰に取り込まれると細胞死をひきおこす。細胞死が起こる際には、活性酸素(ROS)産生が亢進するので、そのメカニズムについて検討した結果、ROS産生亢進はミトコンドリアの膜障害が関係していることが明らかとなった。NCによる細胞死メカニズム解明と同時に、NCの表面被覆剤を検討し、表面被覆剤の量に最適値があること、表面被覆剤が細胞死を起こす場合があることなどを明らかにした。また、マクロファージによる貪食を阻害する効果的なNC表面修飾剤を見出し、その効果を細胞実験とマウス実験で確認した。

研究成果の概要(英文)：Nanocarbons are often engulfed by macrophages in the body. We have studied the macrophage death mechanism caused by carbon nanohorns (CNH), a type of nanocarbons. It is reported that CNHs induced the lysosome membrane instability when macrophages engulfed too many CNHs. With lysosome membrane instability, cathepsin was released from lysosome, causing mitochondrial membrane dysfunction and the cell apoptosis. Reactive oxygen species were also upregulated, and its mechanism has been clarified in this study. The surface coating for NC to avoid the macrophage uptake has been also studied, and could find the very effective one, which was confirmed by cell experiments and animal studies.

研究分野：ナノバイオ

キーワード：ナノカーボン 表面被覆 リソソーム 毒性

### 1. 研究開始当初の背景

ナノカーボン(NC)の応用研究が進み、実用化されているものもあるが、懸念される毒性に関してははっきりしていない。マウス体内に入ったNCの一種であるカーボンナノホーンは、分解あるいは体外排出されるものが40%程度で、他はマクロファージに取り込まれ長期間体内に滞在する。従って、NCの毒性はマクロファージに注目して行うことが妥当である。マクロファージがカギであることは、多層カーボンナノチューブ(MWNT)のなかでもアスベストに形状に近い物の毒性からもわかる。アスベスト形状のMWNTはNCの中でも例外的に毒性がはっきりしているものであり、発がん性すら疑われている。この場合の毒性は、太くて長いMWNTをマクロファージが処理しきれず、フラストレーションをおこし、活性酸素を発生することによるとされている。このように、NCを取り込んだ後のマクロファージの反応が重要であることは明らかであるものの、活性酸素発生機構がはっきりせず、毒性発現機構の解明が望まれている。

これまで、我々はNCの一種であるカーボンナノホーン(CNH)のマクロファージに対する毒性を研究してきた。CNHはマウス体内でマクロファージに取り込まれるものの、炎症反応などといった悪影響は現れず、低毒性である。そこで、CNHの潜在的毒性を引き出すために、CNHを細胞に過剰に取り込ませることで細胞死を起こさせ、その際の、細胞死メカニズムを調べた。その結果、CNHはマクロファージ中のリソソームに入り、リソソーム膜に接触して膜障害を起こさせ、それが発端となってアポトーシスに至ることが明らかとなった。リソソーム膜障害は、他のNCにおいても毒性発現の主要な原因の一つと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究においては、NCによるリソソーム膜障害により細胞死が起こる際のROS発生機構について検討し、リソソーム膜障害によるNCの毒性発現機構を確定する。毒性発現においてNCの表面修飾剤の効果があることは知られているがその詳細は明らかではなく、表面修飾剤由来の毒性発現について検討する。検討結果を参考にして、マクロファージにとらわれにくい表面修飾剤を探索する。

### 3. 研究の方法

(1) CNHが引き起こすRAW264.7細胞のリソソーム膜障害-アポトーシスにおけるROS産生機構解明

RAW264.7細胞培養培地にCNHを大量に投与し、CNHによるリソソーム膜障害-アポトーシスを起こさせ、その際のROS発生とミトコンドリアのROS産生との関係をミトコンドリアに対する抗酸化剤を用いて

調べた。

(2) CNH表面被覆と細胞死機構との関連  
リン脂質PEG(PLPEG)によりCNHが安定的に表面被覆されることを以前確認しているが、奇妙なことに、CNHのRAW264.7細胞に対する毒性は、PLPEGによる被覆率に対してU字形に変化していた。この現象を解明するために、PLPEG被覆率とCNH量を変化させて細胞死との関連を明らかにし、さらに、細胞へのCNH取り込み量を計測し、細胞死とCNHあるいは被覆剤との関連を解明した。

(3) CNHの被覆分子が及ぼすリソソーム膜障害

以前の研究によるとセラミド系の脂質PEG(CPEG)で表面被覆するとCNHの毒性が高まることがわかっている。そこで、CPEGで被覆したCNHを用いて、リソソーム膜障害との関連を、マウスの肝臓・脾臓の組織観察により調べた。

(4) NCがマクロファージにより貪食されにくくなる表面被覆剤の探索

NCの毒性低減化を目的とし、NCをマクロファージに貪食されにくくする表面被覆材を探索した。見出した表面被覆剤がCNHのみならず、単層カーボンナノチューブにも効果的であることを細胞実験とマウス実験により確認した。

### 4. 研究成果

(1) CNHが引き起こすRAW264.7細胞のリソソーム膜障害-アポトーシスにおけるROS産生機構解明

以前の研究において、マクロファージが大量にCNHをとり込むとマクロファージが細胞死することをIn vitro実験により見出した。また、その後の研究により、CNHはマクロファージ中の、リソソーム内に存在し、大量に存在する際には、リソソーム膜障害を起こし、カテプシンなどのリソソーム内酵素を細胞質に放出し、ミトコンドリア膜障害を起こしCaspasaeが活性化され、細胞はアポトーシスに至ることも明らかにした。アポトーシスが起これると同時に、活性酸素産生も活性化されるので、本科研費研究において、活性酸素産生機構を調べた結果、ミトコンドリアが関与していることが判明した。つまり、ROS産生は、CNHのリソソーム膜障害が引き起こすミトコンドリア膜障害によるものであると結論された。

本科研費研究成果とそれ以前に行われた研究の成果をまとめて、誌上発表した。

(2) CNH表面被覆と細胞死との関連

PLPEG被覆によりCNHを水中に分散させる際にPLPEG:CNH(重量)を変化させて、RAW264.7細胞培養用培地に添加し、

添加後 24 時間での細胞死を Bradford アッセイと G6PD アッセイにより評価した。以前に得られた予備実験結果を詳細に検討し、細胞生存率が PLPEG : CNH 増加に伴いいったん増加した後、減少をすることと、その傾向が投与 CNH 量に依存することを確認した。具体的には、投与 CNH 量が 0.03 mg/mL であれば、PLPEG 量を PLPE : CNH =3:1 まで増加させても細胞生存率が減少することはないが、投与 CNH 量 0.1 mg/mL では、PLPEG : CNH=3:1 において細胞生存率が 40%程度へる。CNH 投与量を 0.3 mg/mL まで増加させると PLPEG : CNH =1:1 以上での細胞死が増加し、3:1 の時には細胞生存率 10%となる。

細胞がとり込んだ CNH 量を、細胞溶解液の 700 nm における光吸収強度により測定した結果、細胞死の投与 CNH 量と PLPEG : CNH 比率依存は、細胞内に取り込まれた CNH 量とよく相関していた。また、PLPEG と CNH 量がともに多く投与されたときの結果は、培地中での CNH 凝集粒子サイズ増加とも相関していた。従って、投与 PLPEG 量が増えることにより、培地中の PLPEG 濃度が臨界ミセル濃度以上となり、PLPEG がミセル形成と CNH への吸着という平衡状態に移行したことにより、CNH 被覆している PLPEG 量が減少し、CNH の凝集が進み、凝集サイズが大きくなったと考えられる。このサイズが大きくなったことで、RAW264.7 マクロファージに貪食されやすくなり、細胞内の CNH 量が増加し細胞死を引き起こしたと推定した。この結果は論文投稿準備中である。

ナノカーボンの細胞毒性試験に際しては、界面活性剤を用いてナノカーボンの水溶液分散性を改良する機会が多いが、上述の結果は界面活性剤の多様ふるまいにより、ナノカーボンの毒性評価が影響を受けることを示唆していた。

### (3) CNH の被覆分子が及ぼすリソソーム膜障害

以前の研究によると、セラミド系の脂質 PEG (CPEG) で表面被覆すると CNH の毒性が高まる。そこで、CPEG で被覆した CNH と PLPEG で被覆した CNH をマウスに尾静脈投与したマウスの肝臓と脾臓の保存組織 (パラフィン包埋) を用いて、CNH のマクロファージ内での存在場所とその組織構造を明らかにするために組織学的観察と電子顕微鏡観察を行い、また、鉄の組織内分布を計測することにより以下のことが明らかとなった。

CPEG - CNH は肝臓においてクッパー細胞 (マクロファージ) 内のリソソーム内に存在していた。これは、従来の結果と一致するが、従来結果と異なり、リソソーム膜が部分的に壊れていた。それと同時に、CNH はヘモジデリンといわれる鉄を含むタンパク

質 (赤血球が壊れた結果できる物質) とともに凝集体を形成していた。こうした特殊な凝集体ができる理由としては、CPEG がリソソーム内で分解されてできたスフィンゴシンがリソソーム膜障害を誘発し、その結果リソソーム内の化学的雰囲気を変化させ、その結果、ヘモジデリンと CPEG - CNH が凝集することになったと推定された。同様なリソソーム膜障害は、脾臓においても見られた。コントロール実験として、CPEG ではなく PLPEG を用いて CNH 表面を被覆し得られた PLPEG - CNH を尾静脈投与したマウスの肝臓組織観察を行った。その結果、CNH は同じくクッパー細胞のリソソーム内に集積していたが、リソソーム膜障害は見出されず、また、PLPEG - CNH とヘモジデリンとの凝集体も形成されていなかった。

従って、CPEG - CNH が肝臓や脾臓のマクロファージ内でリソソーム膜障害を引き起こしたのは、CNH が原因ではなく、CNH の表面被覆剤である CPEG によるものと結論された。この研究成果は、誌上に発表した。

### (4) NC がマクロファージにより貪食されにくくなる表面被覆剤の探索

ナノカーボンの毒性低減化は、ナノカーボンが体内でマクロファージにとらわれずに排泄されるようにすることでも達成される。PLPEG など PEG 系物質により被覆したナノカーボンは、これまでの報告によれば、大部分マクロファージにとらわれて体内に長期間滞留する。マクロファージ内のリソソームに入ったナノカーボンはリソソーム膜障害を起こす可能性があり、毒性発現が懸念される。

そこで、マクロファージに捕えられないようなナノカーボンの表面修飾を検討してみた。その結果、PLPEG に比べて著しく効果的にマクロファージの貪食を逃れることができる表面修飾剤 (X) を見出した (特許申請中)。表面修飾剤 X が CNH をマクロファージに貪食されにくくしている効果は、おもに X が CNH を表面修飾する際の安定性にある。PLPEG に比べて、X は CNH 表面からはがれにくく、従って CNH 同士の凝縮を阻止し、サイズが大きくなることでマクロファージに貪食されやすくなることがない。図 1 にマクロファージ RAW264.7 細胞培養の培地に X - CNH と PLPEG - CNH を添加した際の顕微鏡写真を示した。PLPEG - CNH では培地中で凝縮し黒い粒となっているのに対し、X - CNH では黒い粒が現れていない。X 被覆によるこのような効果は In vivo 実験ではさらに顕著な効果を表していた (特許申請中、論文投稿準備中)。

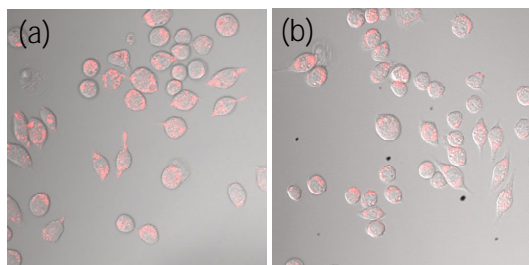


図1 RAW264.7細胞の共焦点顕微鏡写真。培地に X-CNH(a)あるいは PLPEG-CNH (b)を添加後 18 時間経過後に撮影。CNH 濃度 : 0.01 mg/mL。X: CNH あるいは PLPEG:CNH は 1:1 (重量)。

#### 引用文献

- M. Zhang, Y. Tahara, M. Yang, X. Zhou, S. Iijima, M. Yudasaka, Quantification of Whole Body and Excreted Carbon Nanohorns Intravenously Injected into Mice. *Adv. Healthcare*, 3, 2013, 239-244.
- A. Takagi, A. Hirose, T. Nishimura, N. Fukumori, A. Ogata, N. Ohashi, S. Kitajima, J. Kanno. Induction of mesothelioma in p53<sup>±</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33, 2008, 105-116.
- Y. Tahara, M. Nakamura, M. Yang, M. Zhang, S. Iijima, M. Yudasaka. Lysosomal membrane destabilization induced by high accumulation of single-walled carbon nanohorns in murine macrophage RAW 264.7. *Biomaterials* 33, 2012, 2762-2769.
- M. Yan, M. Wada, M. Zhang, K. Kostarelos, R. Yuge, S. Iijima, M. Masuda, M. Yudasaka. A high poly(ethylene glycol) density on graphene nanomaterials reduces the detachment of lipid-poly(ethylene glycol) and macrophage uptake *Acta Biomaterialia*, 9, 2013, 4744-4753.
- M. Yang, M. Zhang, Y. Tahara, S. Chechetka, E. Miyako, S. Iijima, M. Yudasaka. Lysosomal membrane permeabilization: Carbon nanohorn-induced reactive oxygen species generation and toxicity by this neglected mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280, 2014, 117-126.
- M. Yudasaka, M. Zhang, S. Matsumura, R. Yuge, T. Ichihashi, H. Irie, K. Shiba, S. Iijima. Not nanocarbon but dispersant induced abnormality in lysosome in macrophages in vivo *Nanotechnology* 26, 2015, 195102 (10pp)

#### 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)

M. Yang, M. Zhang, Y. Tahara, S. Chechetka, E. Miyako, S. Iijima, M. Yudasaka. Lysosomal membrane permeabilization: Carbon nanohorn-induced reactive oxygen species generation and toxicity by this neglected mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280, 2014, 117-126.

[http://ac.els-cdn.com/S0041008X14002889/1-s2.0-S0041008X14002889-main.pdf?\\_tid=36f41d66-2bc5-11e6-8e79-00000aacb35f&acdnat=1465203851\\_48acdb5c6f8d5920347a12562f78e570](http://ac.els-cdn.com/S0041008X14002889/1-s2.0-S0041008X14002889-main.pdf?_tid=36f41d66-2bc5-11e6-8e79-00000aacb35f&acdnat=1465203851_48acdb5c6f8d5920347a12562f78e570)

M. Yudasaka, M. Zhang, S. Matsumura, R. Yuge, T. Ichihashi, H. Irie, K. Shiba, S. Iijima. Not nanocarbon but dispersant induced abnormality in lysosome in macrophages in vivo. *Nanotechnology* 26, 2015, 195102 (10pp) doi:10.1088/0957-4484/26/19/195102) <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/26/19/195102/meta;jsessionid=AA1EFAB5753589D5651D090291066D2D.c2.iopscience.cld.iop.org>

##### [学会発表](計4件)

中村真紀、田原善夫、深田伸介、張民芳、飯島澄男、湯田坂雅子。Cytotoxicity of carbon nanohorns enhanced by too much PLEPG. 第48回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム、2015年2月3日、東京大学、東京。

湯田坂雅子。カーボンナノホーンと生体との相互作用、第4回CSJ化学フェスタ2-14(招待講演) 2014年10月16日タワーホール船堀、東京。

Masako Yudasaka. Lysosomal membrane permeabilization induced by nanohorn. 5<sup>th</sup> A3 Symposium on Emerging Materials(招待講演) 2014年10月19日、HuiGai Garden Hotel、天津、中国

Masako Yudasaka, Kazuhiko Ishihara. Potential bioapplication of nanocarbons. 9<sup>th</sup> International Symposium of Nanomedicine (ISNM2015), 2015年12月10日12日、三重大学、三重。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：単層カーボンナノチューブを含む熱産  
生脂肪組織造影剤

発明者：湯田坂雅子、蓬田陽平、田中丈士、  
片浦弘道、張民芳

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-194606

出願年月日：2015年9月30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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯田坂 雅子 (YUDASAKA, Masako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナ  
ノ材料研究部門・招聘研究員

研究者番号：70159226

### (2) 研究分担者

横山 敦郎 (YOKOYAMA, Atsuro)

北海道大学・歯学研究科(研究所)・教授

研究者番号：20210627

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：