

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：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670341

研究課題名(和文) ナノファイバーのインフラマゾーム形成機構と毒性評価に関する研究

研究課題名(英文) Inflammasome generation and toxicity of nano-fibers.

研究代表者

平野 靖史郎 (Hirano, Seishiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・室長

研究者番号：20150162

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)：繊維状粒子状物質とエンドトキシンとの複合曝露が、インフラマゾームを介したサイトカイン産生に及ぼす影響について調べるた。まず、粒子状物質が貪食レセプターを介して、貪食作用だけでなくマクロピノサイトーシスによっても細胞内に取り込まれることを明らかにした。また、マクロファージに、繊維状二酸化チタン粒子、リポポリサッカライド、あるいは両者を添加し、同時投与で成熟IL-1betaの分泌が特異的に上昇すること、リソゾームの機能低下により、LC3-Iの脂質付加体であるLC3-II、p62/SQSTM1が上昇したことから、インフラマゾーム形成にオートファジーが関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal how fibrous particulate substances induce inflammasome and inflammation including IL-1beta production in macrophages. This author first investigated the internalization of fibrous particles via a phagocytic receptor and found that the fibers were taken up by the cells via micropinocytosis as well as phagocytosis. Co-exposure to lipopolysaccharide and fibrous titanium dioxide nano-fibers significantly increased release of IL-1beta in macrophages. When, lysosomal function was artificially deteriorated by chemicals such as ammonium carbonate, bafilomycin, and chloroquine, the amount of LC3-II and the LC3-II/LC3-I ratio were increased and this increase was strongly associated with that of p62/SQSTM1, suggesting that autophagy is involved in the inflammasome formation.

研究分野：環境毒性学

キーワード：粒子状物質 マクロファージ エンドサイトーシス 貪食レセプター インフラマゾーム

1. 研究開始当初の背景

粒子状物質は主として呼吸器を介して体内に取込まれる。粒子状物質の中でもナノ粒子とは、直径が100nm以下(大気環境では50nm以下)の粒子に与えられた呼称であるが、ナノ粒子のように粒径が細胞膜間程度のサイズまで小さくなった場合、細胞や組織に対する反応性や、肺胞マクロファージへの取込み機構が、これまでヒト健康影響の研究対象であった微小粒子状物質(粒径2.5ミクロン以下)とは根本的に異なることが懸念されている。「夢の素材」として注目を浴びているカーボンナノチューブは、アスベストと極めて近い形状であり、また繊維径も両者ともに数十ナノメートルであり、繊維状ナノ粒子と考えられる。一方、痛風は、関節において尿酸の繊維状粒子が形成され、それをマクロファージが貪食することにより、細胞内にインフラマゾームが形成され、IL-1betaが産生されることが原因であると考えられており、細胞内における繊維状粒子の挙動とインフラマゾーム形成に注目が集まっている。

2. 研究の目的

ナノマテリアルの中でもカーボンナノチューブはその形状がアスベストに酷似しており、中皮腫の発症も含めてその安全性について大きな疑念が持たれている。カーボンナノチューブや、同様の構造を持つナノファイバーは機械的、あるいは電氣的に特異的な性質を持つため、様々な分野に使われ始めている。近年、これらの細くて長い繊維状粒子状物質は細胞内でインフラマゾームというタンパク複合体を形成し、インターロイキン1ベータ(IL-1beta)の産生を通して、強い炎症反応を惹起することが報告され始めている。マクロファージなどの貪食細胞は、レセプターを介して粒子を細胞内に取り込む。ここでは、貪食レセプターに注目して、ナノファイバーが細胞内においてインフラマゾームを形成する過程機構を明らかにしつつ、繊維状粒子の毒性評価と健康リスクアセスメントに資することを目的とする。

3. 研究の方法

粒子の貪食関与しているマクロファージや、マクロファージに発現している貪食関連膜タンパク質を強制発現させた細胞を用いた *in vitro* 実験を行なった。

細胞や組織の粒子に対する反応性は、粒表面の物計測量と強く関連することが予想されることから、ここでは繊維状酸化チタンなどナノファイバーの動的光散乱法を用いたキャラクタリゼーションと培地への分散方法、細胞への曝露方法を確立した。細胞として粒子状物質のターゲット細胞であるマクロファージ、およびマクロファージの貪食レセプターである Macrophage

Receptor with Collagenous Structure (MARCO) を Green Fluorescence Protein(GFP)をタグとして安定的に発現させた CHO 細胞(GFP-MARCO)を用いた。これらの細胞に、加熱処理によりエンドキシンを除去した多層カーボンナノチューブや繊維状酸化チタンを曝露して、細胞障害性を調べた。細胞によって粒子状物質の取込みに関与する膜タンパク質が異なると考えられること、また必ずしも単一のタンパク質のみで粒子の貪食やエンドサトシスが起これるのではないと考えられることから、クラスリンや細胞骨格を形成するアクチンや中間フィラメントなどのタンパク質についても解析を行なった。ナノファイバーを曝露した細胞においては、粒子が細胞内に完全に取込まれない完全貪食(Frustrated Phagocytosis)や、ファゴゾームと細胞内オルガネラであるリソゾームとの融合が完全でないためにリソゾーム膜が障害を受け、インフラマゾームが形成され様々な炎症反応が惹起されるものと推測されることから、GFP-MARCO に、リソゾーム(Lysosome-associated membrane protein 2, LAPM-2)を免疫蛍光標識して、貪食過程にあるナノファイバーとこれらタンパク質の局在性を蛍光顕微鏡、あるいはレーザー共焦点顕微鏡を用いて調べた。

また、マウス由来マクロファージに、繊維状酸化チタン粒子、リポポリサッカライド(LPS)、あるいは両者を添加した。培養上清を抗体アレイ法や ELISA 法によるサイトカインの定量に、細胞はカスパーゼ1活性や RT-PCR 法によるサイトカイン mRNA 発現量の測定に供した。IL-1betaの産生に及ぼすカスパーゼ阻害剤の効果についても調べた。比較用粒子としてリン酸3カルシウム(TCP)を用いた。また、インフラマゾームの形成を caspase-1 の活性化を指標として western blotting により調べるほか、ELISA を用いてインフラマゾームのベンチマークである熟成型 IL-1beta の産生量を調べた。限外濾過膜を用いて20倍に濃縮した細胞培養液サンプルと、界面活性剤を用いて溶解した細胞内のタンパク質は、電気泳動とウェスタンブロット法を用いて解析し、サイトカインや関連する生体物質のタンパク質レベルでの発現量を定量化した。

4. 研究成果

粒子状物質と細胞や組織との反応は、細胞内に取り込まれてから毒性を発現し生理機能を攪乱する一般の化学物質とは異なり、細胞膜への直接作用が初期反応であり、かつその後細胞内に起こる様々なイベントも細胞膜と粒子表面との反応に端を発しているものと考えられる。

まず、今回の研究で明らかにしたことは、細胞膜に発現した GFP-MARCO は、マクロ

ピノサイトーシスにより細胞内に取込まれていることが観察されたことである。この取込み作用は、細胞骨格を構成するアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンにより抑制された。オートリソゾーム阻害剤の添加により、LC3-I から LC3-II への変化 (lipidation 修飾) が検出されたが、この時 GFP-MARCO が punctate を形成し、またオートファゴソーム形成に必要な LC3B、あるいはオートリソゾームを構成する LAMP2 とそれぞれ共局在していることが明らかとなった。この punctate の形成は、サイトカラシンでは阻害されなかったが、エンドソーム阻害剤である dinasore の添加により阻害された。また、ノコダゾールは punctate を凝集させたが、punctate の形成は阻害しなかった。以上のことにより、環境粒子の貪食に中心的役割を担う MARCO が、エンドサイトーシスを介してオートファジー形成に関与していることが明らかとなった。また、これまでいわれていた貪食作用だけではなく、マクロピノサイトーシスを介しても、粒子状物質が細胞内に取り込まれる可能性を示した。

エンドトキシンの主たる成分であるリポポリサッカライドを曝露したマクロファージでは、IL-1beta の他 G-CSF, GM-CSF, IL-6 の産生が顕著に上昇したが、F-TiO₂ との同時曝露により相乗効果がみられたのは、IL-1beta のみであった。細胞をリポポリサッカライドで前処理した後に繊維状二酸化チタンに曝露した場合には、このような相乗効果は認められなかった。また、TCP も同様にリポポリサッカライドとの相乗効果を示した。IL-1beta の mRNA 発現量は LPS と繊維状二酸化チタンとの同時曝露により相乗的に増加したが、この効果は IL-6 mRNA についても見られた。一方、リポポリサッカライドや繊維状二酸化チタンは細胞内カスパーゼ 1 の活性に影響を及ぼさなかった。以上のことから、マクロファージにおけるリポポリサッカライドと繊維状二酸化チタンとの複合曝露による IL-1beta の産生上昇は、リポポリサッカライドのプライミング効果というよりは、転写活性から成熟 IL-1beta の分泌にわたる一連の効果によるものであると推察される。

さらに、クロロキンやバフィロマイシンなどによりリソゾームの機能低下させることにより、LC3-I の脂質付加体である LC3-II、ならびにその比である (LC3-II / LC3-I) オートファジーの基質として知られている p62/SQSTM1 とそのリン酸体の発現が上昇することを見いだした。興味深いことに、リポポリサッカライド、あるいはリポポリサッカライドと繊維状二酸化チタンを同時に曝露したマクロファージにおいても p62/SQSTM1 の発現は上昇していた。これらのことにより、インフラマゾ

ーム形成にオートファジーが関与していることを明らかにした。さらに、細胞内と細胞外に分泌されたサイトカイン量を比較したところ、IL-6 に比べて IL-1beta 前駆体は細胞内残存量が多いことが分かった。

これまで不明であったアスベストをはじめとする繊維状ナノ粒子の毒性発現機構と生体作用機序に関して、インフラマゾームとオートファジーが関与していることを示すとともに、基盤となるサイトカインの定量データを与えることにより繊維状粒子状物質の生体影響や毒性の評価を行う上での考え方を示した。

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)

1. Seishiro Hirano and Sanae Kanno (2015) Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO) is Processed by Either Macropinocytosis or Endocytosis-Autophagy Pathway. PLoS ONE 10(11) e0142062. 10.1371/journal.pone.0142062. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 平野靖史郎, 古山昭子, 菅野さな枝 (2016) マクロファージの IL-1beta 産生に及ぼす繊維状粒子状物質とエンドトキシンの影響. 第 86 回日本衛生学会 (5 月 13 日、旭川市民会館、北海道旭川市)

2. 古山昭子, 藤谷雄二, 平野靖史郎 (2015) ディーゼル排気由来 SOA の血管内皮細胞への影響. 第 56 回 大気環境学会 年会 (2015 年 9 月 16 日、早稲田大学、東京都新宿区)

3. 平野靖史郎, 菅野さな枝 (2015) マクロファージにおけるリソゾーム機能低下が LC3 の細胞内動態に及ぼす影響. 第 22 回日本免疫毒性学会 (9 月 11 日、京都大学、京都府京都市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Yuji Fujitani, Akiko Furuyama, and Seishiro Hirano Atmospheric Nanoparticles and Their Potential Health Effects. (Ed. Yin-Ji Li, Masakazu Umezawa, Hajime Takizawa, Ken Tanaka, and Tomoyuki Kawada: PM2.5, Role of Oxidative stress in Health Effects and Prevention Strategy) pp143-158 (2015) Nova Science Publisher, New York https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=54274

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野靖史郎 (Hirano Seishiro)
国立研究開発法人国立環境研究所 環境
リスク研究センター 室長
研究者番号：20150162