

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659203

研究課題名（和文） ナノ粒子の生物学的サイズ効果の検討

研究課題名（英文） Biological studies of size-effect by nano-particles

研究代表者

稲葉 カヨ (INABA KAYO)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00115792

研究成果の概要（和文）：石綿やシリカなどの微細粒子は細胞の炎症性応答を生じ、様々な疾患の原因となる。本研究では微細粒子による細胞の炎症性サイトカイン産生機序について検討した。サイズを分けたシリカおよびサイズの明確なラテックスビーズにより貪食能の高いマクロファージを刺激し、炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を検討した結果、細胞には粒子の大きさに依存した異なる IL-1 β 産生経路があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Small particles, such as asbestos and silica, cause inflammatory cellular responses, leading to various types of diseases. In this study, we investigated production mechanism of pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Using size-fractionated silica particles and size-defined latex beads as stimulators, it was indicated that bone marrow-derived macrophages use distinct cellular pathway of IL-1 β production in a particle size-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ (M ϕ) / 樹状細胞 (DC) は微生物だけでなく、外来性の物質や生体内の死細胞など多様な物質を捕捉する。近年注目される石綿、カーボンナノチューブ、酸化チタンやシリカ等に代表されるナノ物質や、それらによって傷害された細胞も M ϕ / DC によって捕捉される。ナノ物質はサイズが小さいが故に特有な性質（サイズ効果）を持つことが懸念されている (Oberdorster et al., 2005, Environmental Health Perspectives 113, 823-839) が、その詳細は明らかではない。最近、M ϕ / DC に取り込まれたシリカ、アスベストおよびミョウバン結晶などが Inflammasome を構成する NLRP3 を活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を起こ

すことが報告され (Destert et al., 2008, Science, 320, 674-677)、このシグナルの上流には細胞内の Reactive oxygen species (ROS) または cathepsin B が関与している事も示唆されている。しかしながら、これらの知見は広範な粒子サイズの混合物を対象とした研究であり、ナノ物質のサイズ効果は明らかではない。一方で、物性面の研究より、20～30 nm 以下のナノ物質では、結晶あたりの表出原子数割合の指数的な増加が認められ、同時に熱力学的に安定なナノサイズ特有の結晶構造をとることも示されている (Auffan et al., 2009, Nature Nanotech., 4, 634)。したがって、このようなナノ物質特有の物理化学的特性が生物活性・毒性を担う可能性が考えられるが、その生物学的データは

示されていない。我々は、平成 17-19 年度に産業技術総合研究所からの委託事業「ナノ粒子の安全性評価方法の標準化」において、種々のナノ物質の生物活性を細胞からのサイトカイン産生を指標に検討してきた。この中で、ナノ物質に対して応答する細胞種が異なることを見出した（平成 19 年度経済産業省委託事業・基準認証研究開発事業「ナノ粒子の安全性評価方法の標準化」報告書参照）。この結果より、細胞株によって異なるナノ物質応答機構が存在することが強く示唆された。

2. 研究の目的

上記の過程で、シリカ粒子を分級（サイズによる分画）しこれらを食食性の優れた骨髄由来 Mφ (BMDM) に加えた場合、サイズの小さなものに細胞内空胞の肥大化の形態変化および炎症性サイトカイン IL-1β の産生昂進を認めた。また、サイズの異なるラテックスビーズ (LxB) においても同様の結果を得た。これらの知見を基に、粒子サイズによる細胞応答経路の違いを詳細に検討し、細胞レベルでサイズ効果の実体を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

BMDM はマウス骨髄細胞より M-CSF を含む L929 細胞の培養上清を用いて誘導した。粗シリカより 1.200 nm 径のものをコンパクターにより、また粗シリカを懸濁した水分散液を遠心(10,000 x g, 10分)した上静より微細シリカを調製した。これらの粒子サイズは動的散乱法にて測定した。また、粒子として径の明確な 1,000、100 および 20 nm の LxB を用いた。BMDM をこれらの粒子と LPS で刺激し、産生されるサイトカインを測定すると共に、電顕等で細胞の形態および粒子の局在を検討した。IL-1β 産生経路を同定する為に、cathepsin B 阻害剤 (CA-075Me) および ROS 産生阻害剤 (NAC、DPI) を用いた。また、cathepsin B の働きは同遺伝子欠損マウス由来 BMDM を用いて確認した。オートファゴソームの形成は LC3-GFP トランスジェニックマウス由来 BMDM を用いて検討した。

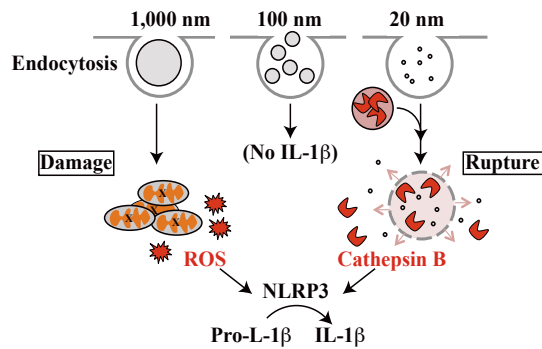
4. 研究成果

始めに BMDM を LPS 存在下で前述の様に分級した 2 つのシリカで刺激したところ、双方共に炎症性サイトカイン IL-1β の産生を誘導した。しかし、微細シリカのみで細胞内空胞の形成を観察した。次に、1,000 nm、100 nm および 20 nm 径の LxB で BMDM を刺激すると、1,000 nm および 20 nm 径 LxB は共に IL-1β の産生を誘導したが、後者のみで空胞の形成が見られた。この過程で、100 nm 径 LxB は IL-1β の産生を誘導せず、1,000 nm および 100 nm

径 LxB はエンドソーム内に、20 nm 径 LxB は主に細胞質内に存在することが明らかとなった。次に、LxB による IL-1β 産生に対する細胞外 K⁺ および NLRP3 欠失の影響を検討した。その結果、1,000 nm および 20 nm 径 LxB による IL-1β 産生は共に顕著に低下した。続いて、IL-1β の産生には細胞内の活性酸素種 (ROS) および cathepsin B が働くことが知られているので、これらに対する阻害剤の影響を検討した。その結果、ROS 阻害剤 N-acetylcysteine (NAC) は 1,000 nm による、cathepsin B 阻害剤 Ca-074-Me は 20 nm 径 LxB による IL-1β の産生を阻害した。以上の結果より、BMDM は LxB に対してサイズ依存的な IL-1β 産生経路を有することが示唆された。

次に、上記の結果を以下の方法で確かめた。cathepsin B 阻害剤が 20 nm 径 LxB の IL-1β 産生を阻害することから、当該 LxB が cathepsin B の食胞からの漏出を生じる可能性が考えられた。そこで、BMDM を 1,000 および 20 nm 径 LxB で刺激したところ、後者でのみ細胞内に活性化 cathepsin B が存在する事を蛍光基質を用いて確認した。さらに、cathepsin B および D 欠失マウス BMDM では、20 nm 径 LxB による IL-1β 産生が cathepsin B 欠失 BMDM でのみ減少する事を確認した。一方で、1,000 nm 径 LxB による IL-1β 産生は ROS 阻害剤の影響を受けることから、ROS の産生誘導を DHR-123 により検討したところ、1,000 nm 径 LxB に強い ROS 産生を認めた。ROS 産生源としてミトコンドリア (mt) を想定し、刺激後の mt の挙動(体積および膜電位)を蛍光基質を用いて検討したところ、1,000 nm 径 LxB では弱いダメージを受けた mt が増加し、20 nm 径 LxB では強く傷害された mt が認められたがその体積は大きく減じていた。よって、1,000 nm LxB の場合は呼吸能をある程度維持した傷害 mt が ROS の産生源であると予想された。一方で、20 nm 径 LxB は LC3-GFP マウス由来 BMDM において多数のオートファゴソームを誘導することから、強く傷害を受けた mt はこの機構により除去されると考えられた。以上の結果より、BMDM の IL-1β 産生に粒子のサイズに依存した経路が存在する事を明らかにした(下図参照)。

これらの結果は、前述のナノ物質におけるサイズ効果の機構を細胞側から説明する糸口を与えるものである。また、これまでの微粒子による炎症応答に関する多くの論文はそれらの粒子サイズ分布の重要性に着目していない。このことが、幾つかの相反する結果を導いている可能性がある。



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 8 件)

(1) Fukuoka, A., Futatsugi-Yumikura, S., Takahashi, S., Kazama, H., Iyoda, T., Yoshimoto, T., Inaba, K., Nakanishi, K. and Yonehara S. (2013) Identification of a novel type 2 innate immunocyte with the ability to enhance IgE production. *Int. Immunol. (in press)*. (10.1093/intimm/dxs160). 査読有り.

(2) Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amakie, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K. and Ohteki T. (2013) A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity (in press)* (10.1016/j.immuni.2013.04.006). 査読有り.

(3) Minamino, K., Takahara, K., Adachi, T., Nagaoka, K., Iyoda, T., Taki, S. and Inaba, K. (2012) IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms. *Int. Immunol.*, 573-581 (10.1093/intimm/dxs060). 査読有り.

(4) Takahara, K., Tokieda, S., Nagaoka, K. and Inaba, K. (2012) Efficient capture of *C. albicans* and zymosan by SIGNR1 facilitates TLR2-dependent TNF- α production by macrophages. *Int. Immunol.* 24:89-96 (10.1093/intimm/dxr103). 査読有り.

(5) Kanamori, K., Tasumi, Y., Iyoda, T., Ushida, M. and Inaba, K. (2012) Sulfatide inhibits α -galactosylceramide presentation by dendritic cells. *Int. Immunol.* 24:129-136 (10.1093/intimm/dxr108). 査読有り.

(6) Takahara, K., Arita, T., Tokieda, S., Shibata, N., Okawa, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J. and Inaba, K. (2012) Difference in fine specificity to polysaccharides of *C. albicans* mannoprotein between mouse SIGNR1 and human DC-SIGN. *Infect. Immun.* 80:1699-1706 (10.1128/IAI.06308-11). 査読有り.

(7) Nakajima, S., Igyarto, B., Honda, T., Egawa, G., Otsuka, A., Hara-Chikuma, M., Watanabe, N., Ziegler, S. F., Tomura, M., Inaba, K., Miyachi, Y., Kaplan, D. H. and Kabashima, K. (2012) Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via TSLP receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:1048-1055 (10.1016/j.jaci.2012.01.063). 査読有り.

(8) Kobayashi, C., Shiina, T., Tokioka, A., Hattori, Y., Komori, T., Kobayashi-Miura, M., Takizawa, T., Takahara, K., Inaba, K., Inoko, H., Takeya, M., Dranoff, G. and Sugita, M. (2012) GM-CSF-independent CD1a expression in epidermal Langerhans cells: evidence from human CD1a genome-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 132:241-244 (10.1038/jid.2011.280). 査読有り.

[学会発表] (計 18 件)

(1) 高原 和彦、稲葉 カヨ
Human C-type lectin DC-SIGN recognizes *C. albicans* more efficiently than *S. cerevisiae* and produces a large amount of IL-10、日本免疫学会、2012.12.5、神戸

(2) 足立 匠、高原 和彦、種子尾 潤、稲葉 カヨ
Distinctive IL-1 β production mechanisms depending on nano- and micro-size particles
日本免疫学会、2012.12.6、神戸

(3) 宇野 賀津子、武曾絵里、猪原敏子、稲葉 カヨ、鈴木和男
Dysfunction of IFN system causes susceptibility to infection in patient with MPO-ANCA-associated vasculitis、日本免疫学会、2012.12.6、神戸

(4) 南野 研人、高原 和彦、足立 匠、長岡 孝治、伊豫田 智典、瀧 伸介、稲葉 カヨ

ヨ

IRF-2 controls antibody production through upregulation of Blimp-1 and class switch recombination、日本免疫学会、2012.12.7、神戸

(5) 伊豫田 智典、牛田 万貴、金森 光広、稲葉 カヨ
Pretreatment with low dose α GC enhanced IFN- γ production by iNKT cells
日本免疫学会、2012.12.7、神戸

(6) 佐藤孝之、北脇年雄、伊豫田智典、稲葉カヨ、岩田誠、樗木俊聡、高折晃史、門脇則光
Identification of human dendritic cells producing a high level of retinoic acid
日本免疫学会、2012.12.7、神戸

(7) 稲葉 カヨ
ノーベル賞に至る樹状細胞研究の発展
日本樹状細胞研究会(招待講演)、2012.6.15、福島

(8) 稲葉 カヨ
樹状細胞による免疫応答の始動と調節
小児アレルギー学会(招待講演)、2012.9.16、大阪

(9) 稲葉 カヨ
My memory of Ralph and the initiation of his work on dendritic cells
International Symposium on Dendritic cells(招待講演)、2012.10.11、Daegu, Korea

(10) 稲葉 カヨ
樹状細胞研究の道
日本ハイオセラピー学会(招待講演)、2012.12.3日、倉敷

(11) 稲葉 カヨ
樹状細胞研究 基礎から臨床への架け橋
日本免疫治療学研究会(招待講演)、2013.2.9、東京

(12) 宇野 賀津子、武曾絵里、猪原敏子、尾松芳樹、稲葉 カヨ、八木克巳、鈴木和男
Dysfunction of IFN system causes susceptibility to infection in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis.
The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012、2012.3.29、東京カンファレンスセンター品川(東京)

(13) 稲葉 カヨ
Dendritic cells in inflammation and immune responses.

The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(招待講演)
2012.3.28、東京カンファレンスセンター品川(東京)

(14) 稲葉 カヨ
樹状細胞研究の歴史と今後
愛知県心身障害者コロニー公開セミナー(招待講演)、2012.2.10
愛知県心身障害者コロニー(春日井市)

(15) 高原 和彦、足立 匠、種子尾 潤、稲葉 カヨ
粒子サイズによる細胞応答性の差異 -細胞には粒子の大きさに依存した応答経路が存在する-
ナノ材料の安全性・社会受容に関するシンポジウム(招待講演)、2012.1.24、京都リサーチパーク

(16) 金森 光広、伊豫田 智典、牛田 万貴、稲葉 カヨ
Sulfatide による樹状細胞の α -galactosylceramide の提示の阻害
日本免疫学会、2011.11.28、幕張メッセ(千葉)

(17) 高原 和彦、時枝 純佳、稲葉 カヨ
C型レクチン SIGNR1 は Dectin-1 と共同して細胞の oxidative burst を促進する
日本免疫学会、2011.11.28、幕張メッセ(千葉)

(18) 伊豫田 智典、稲葉 カヨ
樹状細胞を介する invariant natural killer T細胞の寛容誘導
第21回日本サイトメトリー学会(招待講演)、2011.6.25、京都市国際交流会館(京都)

〔図書〕(計3件)

(1) 稲葉カヨ
医薬の門社
『感染・炎症・免疫』樹状細胞発見の歴史と研究の展開
2012、300-311

(2) 稲葉カヨ
先端医学社
『炎症と免疫』樹状細胞の同定と獲得免疫におけるその役割の発見(受賞者:Ralph M Steinman)
2012、615-620

(3) 稲葉カヨ
日本臨床社
『日本臨床』炎症と免疫応答における樹状細胞

2012、567-574

[その他]

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 カヨ (INABA KAYO)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00115792

(2) 研究分担者

高原 和彦 (TAKAHARA KAZUHIKO)

京都大学・大学院生命科学研究科・講師

研究者番号：90301233

(3) 連携研究者

無し