

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15236

研究課題名(和文) ナノカーボンによるインフラマソームを介した血管における炎症誘導機構の解明

研究課題名(英文) Inflammatory responses triggered by inflammasome activation after exposure to carbon nanotubes

研究代表者

市原 佐保子 (ICHIHARA, Sahoko)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20378326

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)：本研究では、今後その応用が期待されているナノカーボンに注目し、動脈硬化や血管修復に対する影響を検討し、その作用機序を解明することを目的とした。二層カーボンナノチューブの高濃度投与にて、動脈硬化モデルマウスの大動脈弓における粥腫面積が増加し、インフラマソームの中心的構成因子であるNLRP3の発現と、炎症性因子(VCAM-1, ICAM-1)とサイトカイン(MCP-1)の発現が増加した。二層カーボンナノチューブの高濃度投与は、動脈硬化巣形成を誘発し、その作用機序として、インフラマソームによる炎症誘導機構が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice treated with double wall carbon nanotubes (DWCNTs) at the high dose showed increased plaque area in the aorta by oil red O staining. The expression of NLRP3, which is a central constitutive factor of inflammasome, and the expression of inflammatory factors (VCAM-1, ICAM-1) and cytokine (MCP-1) were significantly increased in ApoE^{-/-} mice treated with long DWCNTs at the high dose. Furthermore, in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with the high dose of DWCNTs the level of cytokine (IL-1) was significantly elevated. The results suggested that DWCNTs induced the formation of arteriosclerotic lesion due to enhancing inflammatory responses triggered by inflammasome activation.

研究分野：環境衛生学

キーワード：炎症 ナノ素材 心血管系 安全性評価

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズ(100 ナノメートル以下)に物質のサイズを制御することが可能となり、新たな物質・材料としてその応用性が期待されている。反面、新たな物性を持つため、従来の測定法では有害性の定量評価が出来ず、ヒトに対する未知の有害性リスクを有する可能性が懸念されている。工業的ナノ素材による重大なリスクを回避して有効利用するためにも、早期の生体影響に関する安全性評価の実施が必要である。

2. 研究の目的

ナノ素材は、肺胞を取り囲む毛細血管内皮細胞と基底膜で形成される血液空気関門を通過し、血液循環に到達する可能性があり、工業的ナノ素材の血管系への影響に対する影響評価とその作用機序の解明が待たれている。本研究では、今後その応用が期待されているナノカーボン(カーボンナノチューブ)に注目し、動脈硬化や血管修復に対する影響を検討し、その作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト大動脈内皮細胞(HAECs)を培養し、単層カーボンナノチューブと二層カーボンナノチューブを投与し、MTS assay 法にて細胞生存率を検討した。ナノ素材投与後の細胞上清で、細胞遊走に關与する単球走化性タンパク質(MCP-1)の活性を分析し、ナノ素材投与後の血管内皮細胞における接着因子の発現をウェスタンブロット法で解析した。また、単球の血管内皮細胞への接着や侵入の程度を解析した。

(2) 動脈硬化モデルマウスであるアポリポ蛋白 E (ApoE)欠損マウスを使用し、単層カーボンナノチューブと二層カーボンナノチューブを 14 日間、咽頭内投与し、血管障害への影響を検討した。カーボンナノチューブ投与後に、大動脈弓における動脈硬化の程度を検討し、また、末梢血と骨髄における血管内皮前駆細胞数を測定し、動脈に対する影響への役割を分析した。

(3) 動脈硬化モデルマウス:ApoE 欠損マウスに short と long 二層カーボンナノチューブを 1 週間に 1 回、連続 8 週間、咽頭吸引法により投与した。その後、大動脈弓を oil red 染色し、粥腫形成の程度を評価した。また、胸部大動脈から RNA を抽出し、インフラマソーム構成因子の発現を解析した。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に二層カーボンナノチューブを投与し、インフラマソーム構成因子への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 培養した血管内皮細胞に単層および二層カーボンナノチューブを投与したところ、濃

度依存的に細胞生存率を減少させた。さらに、単層および二層カーボンナノチューブの投与は単球と内皮細胞との接着を著しく増加させた(図1)。以上の結果より、血管内皮細胞における接着能の亢進が動脈硬化の進展を引き起こす可能性が示唆された。

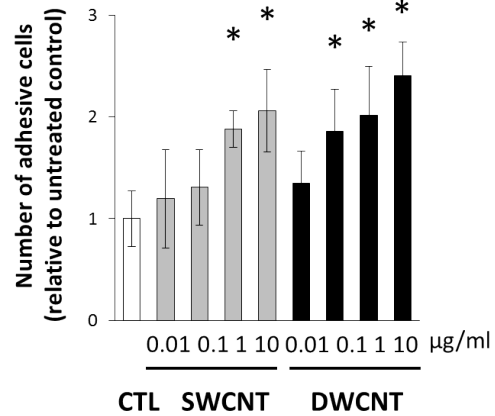


図1. 内皮細胞に接着した単球の相対数

(2) ApoE 欠損マウスに単層カーボンナノチューブと二層カーボンナノチューブを 14 日間投与したところ、高濃度群で大動脈の粥腫形成の亢進が認められた。また、大動脈における接着因子(ICAM-1)の発現の増加が確認された。血管内皮前駆細胞(EPC)は、骨髄から循環血中に動員され、その後、血管内皮損傷部位に移動すると言われている。カーボンナノチューブ投与後の骨髄中の EPC の機能への影響を検討したところ、カーボンナノチューブの投与は EPC のコロニー形成単位を減少させ、遊走機能を減弱させた(図2)。これらの結果より、単層および二層カーボンナノチューブは、単球の内皮細胞への接着を促進し、EPC 機能不全を誘発することにより、粥腫形成を増強する可能性が示唆された。

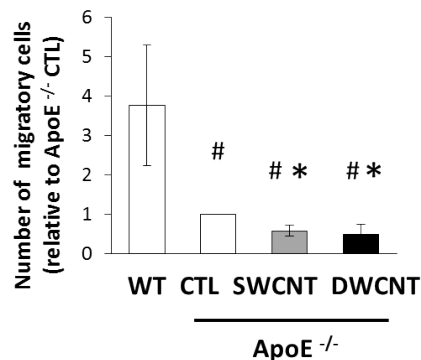


図2. 遊走した血管内皮細胞の数

(3) 二層カーボンナノチューブの高濃度投与にて、動脈硬化モデルマウスの大動脈弓における粥腫面積が増加した。また、インフラマ

ソームの中心的構成因子である NLRP3 の発現と、炎症性因子 (VCAM-1, ICAM-1) とサイトカイン (MCP-1) の発現は、long 二層カーボンナノチューブの高濃度投与群で有意に増加していた。また、培養細胞の実験では、DWCNT の高濃度投与で、サイトカイン (IL-1 β) のレベルが有意に上昇した(図3)。以上の結果より、二層カーボンナノチューブの高濃度曝露は、動脈硬化巢形成を誘発し、その作用機序として、インフラマソームによる炎症誘導機構が関与している可能性が示唆された。

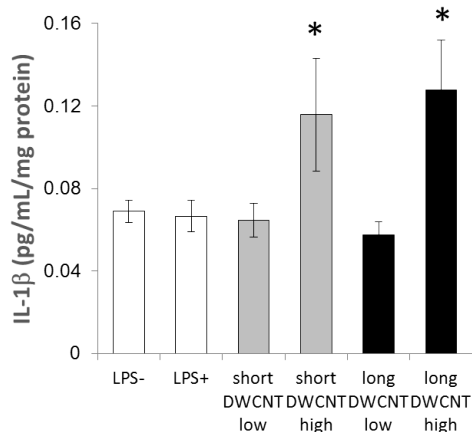


図3. 内皮細胞におけるIL-1 β の発現

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 7 件)

Kuzuya K, Ichihara S, Suzuki Y, Inoue C, Ichihara G, Kurimoto S, Oikawa S. Proteomics analysis identified peroxiredoxin 2 involved in early-phase left ventricular impairment in hamsters with cardiomyopathy. *Plos One* 2018;13:e0192624.
DOI: 10.1371/journal.pone.0192624.

Ichihara S, Suzuki Y, Chang J, Kuzuya K, Inoue C, Oikawa S. Involvement of oxidative modification of proteins related to ATP synthesis in the left ventricles of hamsters with cardiomyopathy. *Sci Rep* 2017;7:9243.
DOI: 10.1038/s41598-017-08546-1.

Huang F, Ichihara G, Yamada Y, Banu S, Ichihara S. Effect of 4-week inhalation exposure to 1-bromopropane on blood pressure in rats. *J Appl Toxicol* 2017;37:331-338.
DOI: 10.1002/jat.3364.

Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Hayashi Y, Izuoka K, Kataoka M, Ichikawa S, Wu W, Zong C, Ichihara G, Ichihara S. Single- and double-walled carbon nanotubes enhance atherosclerosis by promoting monocyte adhesion to

endothelial cells and endothelial progenitor cell dysfunction. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:54.
DOI: 10.1186/s12989-016-0166-0

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Fukatsu H, Shimanuki Y, Tanaka N, Suzuki Y, Murakami M, Izuoka K, Chang J, Wu W, Yamada Y, Ichihara S. Titanium dioxide particle type and concentration influence the inflammatory response in Caco-2 cells. *Int J Mol Sci* 2016;17:576.
DOI:10.3390/ijms17040576

Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Ding X, Maynard A, Kobayashi T, Ichihara G. Exposure assessment and heart rate variability monitoring in workers handling titanium dioxide particles—a pilot study. *J Nanopart Res* 2016 18:52.
DOI: 10.1007/s11051-016-3340-2.

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Yamada Y, Mishima T, Ichihara S. Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles was involved in the attenuation of vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. *Toxicol Rep* 2015;2: 692-701.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750015000505>

[学会発表](計 20 件)

岩瀬 優、鈴木 悠加、出岡 淑、宗 才、市原 学、市原 佐保子：カーボンナノチューブによる血管における炎症誘導機構の解明 第 17 回分子予防環境医学研究会 2018

林田 有紗、市原 学、渡辺 英里、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、市原 佐保子：酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性による影響 第 12 回ナノ・バイオメディカル学会 2017

Sandra Vranic, Eri Watanabe, Yurika Osada, Sahoko Ichihara, Wenting Wu, Toshihiro Sakurai, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, Sonia Boland, Lang Tran, Gaku Ichihara. Surface modifications of silica nanoparticles affect their uptake by the cells and subsequent pulmonary toxicity. 8th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Elsinore, Denmark 2017

長田 百合果、渡邊 英里、Sandra VRANIC、市原 佐保子、櫻井 敏博、鈴木 利宙、市原 学：シリカナノ粒子の表面修飾と RAW264.7 細胞応答との関係 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田

百合果、市原 学：酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性による血管内皮細胞への影響 第 87 回日本衛生学会学術総会 2017

Sandra Vranic、渡邊 英里、市原 佐保子、呉 文亭、長田 百合果、張 靈逸、櫻井 敏博、Sonja Boland、Lang Tran、市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症誘導作用との関係 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム 2016

Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Gaku Ichihara. Effect of physicochemical characteristics of nano-sized TiO₂ on adhesion of monocytes to endothelial cells. 11th International Particle Toxicology Conference, Singapore, Republic of Singapore, 2016

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田 百合香、市原 学：酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性による血管内皮細胞への影響の検討 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2016

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田 百合果、市原 学：酸化チタンナノ粒子による血管内皮細胞への単球の接着能に対する影響 第 43 回日本毒性学会学術年会 2016

Gaku Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Sahoko Ichihara. Effects of nano-sized TiO₂ on the adhesion of monocytes to endothelial cells by the differences in the crystal structure and characteristics of the surface of nanoparticles. 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology, Serville, Spain, 2016

渡邊 英里、サンドラ ブラニッチ、市原 佐保子、呉 文亭、鈴木 利宙、長田 百合果、ソニア ポーランド、ラン トラン、櫻井 敏博、安部 良、市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症誘導作用との関係 第 43 回日本毒性学会学術年会 2016

市原 学、小林 隆弘、市原 佐保子：ナノマテリアル有害性評価と労働環境衛生学 第 43 回日本毒性学会学術年会 2016

Gaku Ichihara, Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Wenting Wu, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Toshihiko Sakurai, Sonja Boland, Lang Tran. Surface modifications of silica nanoparticles affect their

uptake by the cells and subsequent pulmonary toxicity. 8th International Nanotoxicology Congress, Boston, USA, 2016

市原 佐保子、鈴木 悠加、呉 文亭、出岡 淑、伊東 健、山本 雅之、市原 学：吸引投与による多層カーボンナノチューブの影響とその作用機序の検討 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016

渡邊 英里、ブラニッチ サンドラ、市原 佐保子、呉 文亭、鈴木 利宙、林田 有紗、長田 百合果、張 靈逸、ポーランド ソニア、トラン ラン、櫻井 敏博、安部 良、市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症誘導作用との関係 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016

鈴木 悠加、市原 学、呉 文亭、伊東 健、山本 雅之、出岡 淑、市原 佐保子：Nrf2 欠損マウスにおけるカーボンナノチューブの影響と作用機序の検討 第 15 回分子予防環境医学研究会大会 2016

Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Yurika Osada, Arisa Hayashida, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Gaku Ichihara. Effects of nano-sized TiO₂ on the adhesion of monocytes to endothelial cells. The 55th Annual Meeting of Society of Toxicology and ToxExpo, New Orleans, USA, 2016

Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Wenting Wu, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Toshihiro Sakurai, Sonja Boland, Lang Tran, Gaku Ichihara. Surface modifications of silica nanoparticles affect their uptake by the cells and subsequent pulmonary toxicity. The Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo, New Orleans, USA, 2016

Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Saeko Tada-Oikawa, Kiyora Izuoka, Cai Zong, Gaku Ichihara. Single-wall or double-wall carbon nanotubes induce atherosclerosis progression in animal and culture models of atherosclerosis. 7th International Congress of Asia Society of Toxicology, Jeju Island, Korea 2015

ヴラニック サンドラ、市原 佐保子、呉 文亭、渡邊 英里、櫻井 敏博、ポーランド ソニア、トラン ラン、市原 学：シリカナノ粒子の表面修飾はマウス肺炎反応に影響を与える フォーラム 2015：衛生薬学・環境トキシコロジー 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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
<http://>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 佐保子 (ICHIHARA Sahoko)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：20378326

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

研究者番号：