

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19714

研究課題名(和文)チタン酸ナノシートの毒性機序および免疫機能影響の探索的研究

研究課題名(英文) Exploratory research for toxic machinery of titanate nanosheet leading to immunological influences

研究代表者

西村 泰光(Nishimura, Yasumitsu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：チタン酸ナノシート(TiNS)は極薄の特徴を生かした工業利用が期待されているが、その毒性影響については調べられてこなかった。細胞培養実験から、TiNS曝露がヒト単球に著しい空胞形成を伴いカスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導し、その毒性にはTiNSの取り込みに端を発しTRPMLチャンネルを介したリソソーム由来細胞内Ca²⁺濃度の増加と続くリソソーム形成の過剰亢進に起因する機序が関わるということが明らかとなった。カテプシン阻害剤は細胞死を抑制せず増悪させ、既知のリソソーム性細胞死とは異なる毒性機序の存在を示す。TiNS曝露による単球マクロファージ系細胞を介した免疫機能変容の関わる健康影響が危惧される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

期待の新素材であるチタン酸ナノシート(TiNS)に特徴的な毒性があることを明らかにできた。チタン酸化物は毒性の低い物質と捉えられてきたが、二酸化チタンナノ粒子(TiO₂-NP)の毒性に関する報告が多数報告されたことが契機となりIARCにおけるカテゴリーが変更されるに至った。TiNSはTiO₂-NPと異なるレピドクロサイト結晶構造をとり、これに起因した高陽イオン交換能の特徴を持つことから独自の機序に基づく毒性が危惧された。本研究成果は、この未知のTiNSの毒性とその機序とを初めて明らかにした。研究成果はTiNS曝露による健康影響の可能性を示し、薬剤標的となり得る新たな機序を捉えた意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Titanate nanosheet(TiNS) is a promising material with ultra thinness, but the toxicity of it has not been examined to date. The present study with cell culture experiments revealed that TiNS exposure causes caspase-dependent apoptosis of human monocytes with huge vacuolation, the toxic machinery of which is attributed to excessive generation of lysosomes due to increase in calcium ion released from lysosomes via TRPML channels following engulfment of TiNS. Cathepsin inhibitor did not suppress but exacerbated cell death caused by TiNS exposure, indicating that the machinery differs from well-known lysosomal cell death. Those findings suggest disorders related to altered immune functions due to monocyte-macrophage-lineage cells exposed to TiNS.

研究分野：毒性学

キーワード：ナノ毒性 チタン 産業衛生 免疫 単球 アポトーシス リソソーム カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

チタン酸化物は工業的に広く利用され毒性の低い物質として認識されてきた。しかし、2010年に国際がん研究機関が二酸化チタン(TiO_2)の Group2B への分類引き上げへの決定をするなど、その根拠として特に“チタン酸化物ナノ物質”の毒性影響についての危惧が高まりつつある状況であった。一方、チタン酸ナノシート(TiNS)は厚さが1nm以下の極めて薄い結晶構造を持つチタン酸化物2Dナノ物質として触媒や半導体への工業利用が期待されていた。TiNSの特徴的形狀は TiO_2 粒子と異なりTiNSがレピドクロサイト結晶構造を持つことに由来する。我々は、産業衛生的観点からヒト末梢血単核細胞(PBMC)を用いて毒性を調べたところ、TiNSが石綿と同程度の毒性でヒト単球に著しい空胞形成を伴うアポトーシスを誘導し、空胞内部にTiNSが存在し、空胞形成にはエンドソーム経路が関わることを見いだした。このような細胞死の様態は他のナノ粒子・繊維において報告されてきたことは無く、TiNSの毒性影響にはその物理化学的特徴に起因する未知の毒性機序が関わることを示唆された。

2. 研究の目的

そこでTiNSの毒性機序に細胞内膜系への作用が関与するとの仮説のもと、TiNS曝露下培養時の単球中のリソソームとオートファジーの解析を行い TiO_2 -P25ナノ粒子曝露時と比較した。さらに、毒性機序におけるリソソーム機能へのTiNS曝露影響が捉えられたことから、近年新たなシグナルとして注目されるリソソーム由来 Ca^{2+} イオンに着目し、免疫機能に影響を与え得る単球へのTiNS毒性機序について種々の解析を行った。

3. 研究の方法

(1)TiNSの合成および正常の確認

TiNSは液相合成法により既報に倣い合成された。TEMとDLS分析(Zetasizer)からTiNSの約20-30nmの菱形形状と平均26.45nmの狭い粒度分布を確認した。また、XRD解析およびラマンスペクトル解析を行い、ナノシート特有のピーク位置を示すことを確認した。

(2)ヒト単球の単離と培養

同意を得た健康人より提供された末梢血からFicoll-Hypaque法にてPBMCを調整し、PBMCから磁気分離により $\text{CD}14^+$ 単球を単離した。10 $\mu\text{g/ml}$ TiNSまたは TiO_2 -P25(日本アエロジル社製)曝露下で10%FBS含RPMI1640培地を用いて単離した単球を培養した。培養開始時に種々の阻害剤を添加し、以下の測定による分析から毒性機序を解析した。

(3)フローサイトメトリー

培養後回収した細胞におけるリソソーム量とアポトーシス細胞比率および細胞質内 Ca^{2+} 濃度はフローサイトメトリーにより測定された。リソソーム量はNBD-PZ染色による蛍光強度を指標とした。アポトーシス細胞はAnnexin V(Anx)・PI染色によりAnx陽性PI陰性となる細胞として定義された。細胞質内 Ca^{2+} 濃度はFluo-4 AM染色後の蛍光強度により比較した。

(4)TiNSへの Ca^{2+} の結合の確認

TiNSへの Ca^{2+} の結合の有無を確認するため、TiNSと塩化カルシウム溶液を混和し、エリオクロームブラックTを用いた遊離 Ca^{2+} の定性評価とSEM-EDXによるTiNS表面の元素分析を行った。

(5)Realtime RT-PCR

培養後回収した単球よりtotal RNAを抽出後、逆転写によりcDNAを合成し、SYBR Green色素を用いたrealtime PCRにより種々の遺伝子のmRNAレベルを測定した。mRNAレベルはGAPDHを内部標準として相対定量した。

4. 研究成果

(1)研究の主な成果

TiNS毒性機序におけるリソソーム過剰生成

TiNSと TiO_2 -P25曝露共に1,2日後のNBD-PZ平均蛍光強度を増加させたが、7日になると TiO_2 -P25群では小康した一方、TiNS群ではMFIが著しく増加し、差は5倍となった。オートファジー関連遺伝子群のmRNA量変化を調べたところ、 TiO_2 -P25群は何れの遺伝子mRNA量も対照群と差を示さなかったが、TiNS群ではFIP200, ATG101(ULK複合体), Beclin-1(PI3K複合体), DFCP1(omegasome形成), ATG12, ATG5, ATG7, ATG10(ATG12系), ATG4A, ATG4B, ATG4D, ATG3(LC3系)のmRNA量が対照群または TiO_2 群と比べ有意に高い値であった。以上の結果は、TiNS曝露後の単球では粒子状 TiO_2 曝露では起こらないほどリソソーム量が異常に高まっていること、オートファジーを担う多くの遺伝子の転写発現量が高まっていることを示す。そこで、TiNS曝露によるリソソーム過剰生成とオートファジー亢進のアポトーシスへの関与について阻害剤を用いて調べた。TiNS曝露下培養7日後の単球のアポトーシスを調べたとき、液胞型ATPアーゼ(v-ATPase)阻害によりリソソーム機能を抑制するbafilomycin A1は巨大空胞形成を抑制し、アポトーシスも抑制した。一方、オートファジーで働くPI3Kの阻害剤であるwortmanninは単独でアポトーシスを誘導し、またTiNS曝露時のアポトーシスを亢進も抑制もしなかった。以上の結果から、TiNSの毒性機序にはv-ATPaseを介したリソソームの過剰生成が関わる事が明らかとなった。

毒性機序における細胞質内 Ca²⁺イオンの関与

ここまでの結果は、細胞内に取り込まれた TiNS が何らかの機序を介してリソソームの過剰生成を引き起こしていることを示した。リソソーム機能遺伝子は細胞内 Ca²⁺シグナルにより発現制御されることが知られる。TiNS はそのレピドクロサイト構造に起因し高い陽イオン交換能を持ち、細胞内への Ca²⁺の持ち込みを介して細胞内 Ca²⁺濃度に影響することが示唆された。そこで、TiNS への Ca²⁺イオンの結合の有無および TiNS 曝露による細胞内 Ca²⁺濃度の変化を調べた。エリオクロームブラック T は Ca²⁺、Mg²⁺の指示薬であり、それらの金属イオンと錯形成し青色から赤色へ変化する。TiNS と塩化カルシウム溶液を混和させエリオクロームブラック T を反応させたとき、TiNS 濃度に依存して赤色へと変わらず青色が維持された。また混和後の TiNS を回収し SEM 観察下で EDX による元素分析を行ったとき、TiNS 表面から Ca に特有のピークが検出され、TiNS に Ca²⁺が結合することが確認された。培養 1 日後に回収した単球の細胞質内 Ca²⁺濃度を Fluo-4 AM を用いて調べたとき、TiO₂-P25 とは対照的に TiNS 曝露下培養後の単球では蛍光強度が有意に増加した。以上の結果から、TiNS は Ca²⁺イオンを結合させることが確認され、また TiNS 曝露により細胞質内の Ca²⁺濃度が上昇していることが明らかとなった。

毒性機序における TRPML とリソソーム由来 Ca²⁺シグナルの関与

これまでに TiNS 曝露後に形成される空胞内部に多数の TiNS が確認されていることから、TiNS と同時に Ca²⁺が取り込まれ、リソソームに由来する Ca²⁺が TiNS 毒性機序に関わることが示唆された。リソソーム内 Ca²⁺の細胞質への放出はリソソーム膜中の TRPML/MCOLN チャンネルにより担われている。そこで単球の TiNS 曝露下培養時に TRPML1/MCOLN1, TRPML2/MCOLN2, TRPML3/MCOLN3 の選択的作動薬である ML-SA1 を添加し、TiNS 曝露によるアポトーシスへの影響を調べた。ML-SA1 添加は単独ではアポトーシスを誘導しなかったが、一方で TiNS 曝露群への ML-SA1 添加はアポトーシスを有意に上昇させた。この結果は、リソソームからの Ca²⁺の放出が TiNS の毒性機序に関わることを間接的に示した。次に培養 2 日後の単球を回収し v-ATPase 構成分子である ATP6V1E1 および TRPML1, TRPML2, TRPML3 の mRNA レベルを調べた。TiO₂-P25 曝露とは対照的に TiNS 曝露群では ATP6V1E1, TRPML1, TRPML3 mRNA レベルが有意に増加していることが分かった。細胞質内 Ca²⁺キレート剤である BAPTGA AM の培地への添加は、これらの mRNA レベルの増加を明瞭に抑制した。以上の結果から、リソソームに由来する Ca²⁺の放出が TiNS 毒性機序に関わること、細胞質内 Ca²⁺濃度増加が TRPML チャンネル発現増加を誘導していることが明らかとなった。増加したリソソーム膜中の TRPML チャンネルが細胞内 Ca²⁺濃度増加を引き起こし、正のフィードバックループとなり遺伝子発現誘導が加速し、リソソームの止めどない生成と成長の結果として細胞死が誘導されることが TiNS 毒性機序の本質と推定される。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により TiNS 毒性機序の実態を明らかにすることができた。TiNS 曝露によって引き起こされる単球のアポトーシスは細胞内 Ca²⁺増加により加速的に進むリソソーム制御不全に起因した細胞死であることが分かった。既知のリソソーム性細胞死はリソソーム膜の破綻により細胞質に放出されるカテプシンに依存するが、TiNS 曝露により誘導されるアポトーシスはカテプシン阻害剤により抑制されず寧ろ増悪することを確認しており、このことから TiNS が引き起こす細胞死は独自の機序に因ると説明できる。それらの知見は国内外においてこれまで全く知られてこなかったものであり、大きなインパクトを持つ。免疫系において単球はマクロファージや樹状細胞へ分化し、自然免疫だけでなく抗原提示能を介して獲得免疫を支える役割を担う。研究成果より得られた知見から、単球やマクロファージ系細胞への毒性影響を介した TiNS の免疫機能を中心とする生体影響が危惧される。TiNS は期待のナノ材料として今後の更なる研究開発や産業利用が期待されるが、同時に産業保健・環境保健の視点からの曝露防止措置の必要性が示唆される。他方で、明らかになった機序は、細胞死を誘導する標的として新たな薬剤開発への重要な科学的基盤情報ともなる。

(3)今後の展望

上述のように、単球への毒性影響は生体の免疫機能を乱すと予想される。マクロファージや樹状細胞への TiNS 曝露影響の機能解析は危惧される免疫機能影響の実態解明に大きな一歩となるはずである。また、これまでに培養時の TiNS 曝露が T リンパ球の遺伝子発現にも影響を与えることを確認しており、T 細胞のサイトカイン産生能や細胞傷害性についての詳細な解析が獲得免疫への TiNS 曝露影響の解明に重要となるだろう。リソソーム由来 Ca²⁺シグナルの正のフィードバックループを引き起こす化合物の探索は新たな薬剤開発の萌芽となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshioka Daisuke, Nishimura Yasumitsu, Katsumata Ken-ichi	4. 巻 194
2. 論文標題 Synthesis and fluorescence properties of lanthanide-supported titanate nanosheets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Luminescence	6. 最初と最後の頁 316 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlumin.2017.10.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮川雅矢, 石田玉青, 藤村卓也, 由井樹人, 吉岡大輔	4. 巻 58
2. 論文標題 粘土および類縁体を用いたナノ粒子の合成と機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 粘土科学	6. 最初と最後の頁 26 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11362/jcssjnendokagaku.58.1_26.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Suni L, Ito T, Otsuki T
2. 発表標題 The Toxicity of Titanate Nanosheets Attributed to Out-of-Control Function of Lysosomes Caused by Increase in Intracellular Calcium Ions
3. 学会等名 Society of Toxicology (SOT) 60th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村泰光, 吉岡大輔, 武井直子, 李順姫, 吉留敬, 伊藤達男, 大槻剛己
2. 発表標題 チタン酸ナノシートの毒性機序における細胞内Ca ²⁺ 増加を介したリソソーム制御不全
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Nishimura, D. Yoishioka, N. Kumagai-Takei, S. Lee, K. Yoshitome, and T. Otsuki
2. 発表標題 Titanate nanosheets cause vacuolar ATPase-dependent apoptosis of human monocytes through lysosomal toxicity not related with augmented autophagy
3. 学会等名 Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke YOSHIOKA, Yasumitsu NISHIMURA
2. 発表標題 Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metals Supporting onto Titanate Nanosheets
3. 学会等名 2019 Euroclay (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 泰光, 吉岡 大輔, 武井 直子, 李 順姫, 吉留 敬, 大槻 剛巳
2. 発表標題 チタン酸ナノシートの細胞毒性における小胞酸性化と液胞型ATPアーゼ依存性
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 泰光, 吉岡 大輔, 李 順姫, 武井 直子, 吉留 敬, 伊藤 達雄, 大槻 剛巳
2. 発表標題 チタン酸ナノシートの毒性機序におけるTRPMLチャンネルの関与
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡 大輔, 西村 泰光
2. 発表標題 液相合成したチタン酸ナノシートへの金属担持に及ぼすハロゲン化物水素酸添加の 効果
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡 大輔, 西村 泰光
2. 発表標題 チタン酸ナノシートへの金担持, 銀担持に及ぼすハロゲン化水素酸の添加効果
3. 学会等名 低次元系光機能材料研究会第9回サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好 桃佳, 加藤 利喜, 吉岡 大輔, 宮元 展義
2. 発表標題 単分散ナノシートコロイドを用いた液晶層の発現
3. 学会等名 低次元系光機能材料研究会第9回サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T
2. 発表標題 Nanotoxicity of titanium nanosheets for human immune cells
3. 学会等名 ICOH (International Congress on Occupational Health) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、李順姫、吉留敬、大槻剛巳
2. 発表標題 チタン酸ナノシート曝露によるヒト単球培養時のオートファジー関連遺伝子発現量変化
3. 学会等名 第25回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、吉留敬、大槻剛巳
2. 発表標題 チタン酸ナノシート曝露後の単球におけるアポトーシスの機序解析，リソソーム・オートファジー機能との関連
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、李順姫、吉留敬、大槻剛巳
2. 発表標題 ヒト単球へのチタン酸ナノシートのv-ATPase依存的リソソーム毒性
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡大輔、西村泰光
2. 発表標題 チタン酸ナノシートと金属酸化物の光電析法による機能性の付与
3. 学会等名 第62回粘土科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡大輔、西村泰光
2. 発表標題 チタン酸ナノシートの合成および反応性における種々のテトラアルキルアン モニウム塩の系統的評価
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yasumitsu Nishimura, Daisuke Yoshioka, Naoko Kumagai-Takei, Suni Lee, Hidenori Matsuzaki, Kei Yoshitome, Takemi Otsuki	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 -
3. 書名 Cytotoxicity	

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学衛生学ホームページ https://m.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉岡 大輔 (Yoshioka Daisuke) (40638318)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大槻 剛巳 (Otsuki Takemi) (40160551)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	武井 直子 (Kumagai-Takei Naoko) (00509276)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	李 順姫 (Lee Suni) (70414026)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関