

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12351

研究課題名（和文）多層カーボンナノチューブにより惹起されるエフェロサイトーシス阻害機構の解明

研究課題名（英文）Defect of apoptotic neutrophil efferocytosis caused by multi walled carbon nanotubes

研究代表者

田部井 陽介（TABEL, Yosuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40555083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は、多岐にわたる分野での応用が期待されている一方、ヒトへの健康への影響が懸念されている。好中球様細胞に分化したHL-60細胞を用い、MWCNTが及ぼす影響について解析したところ、マクロファージによるエフェロサイトーシスを回避させるMWCNTが存在することが見いだされた。また、これらMWCNTは、好中球の細胞内カルシウム濃度を低下させ、細胞外へのホスファチジルセリン提示を抑制することにより、効率的なエフェロサイトーシスの阻害を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ材料は多岐にわたる分野での応用が期待されている一方、微小物質という形体的特徴から、ヒトの健康への影響が懸念されている。しかしながら、現在までのところ、ナノ材料の安全性を確保するための十分な情報は得られておらず、生体内に侵入したナノ材料が好中球に及ぼす影響に関しては全くの未知であった。本課題が明らかにした多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の物性と好中球への影響は、MWCNTのみならず、他のナノ材料の安全な取り扱い方針策定や新規ナノ材料の開発に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) are one of the most intensively explored materials because of their unique properties. Due to the widespread use of MWCNTs, it is important to investigate their effects on human health. The present study was designed to investigate the mechanisms of MWCNT toxicity toward neutrophil-like differentiated HL-60 cells. First, it was found that MWCNTs inhibited efferocytosis of apoptotic HL-60 cells by macrophages. Furthermore, MWCNTs induced the decrease of intracellular calcium levels and inhibited the exposure of phosphatidylserine (PtdSer) on the cell surface. These results indicated that MWCNTs disrupt the exposure of PtdSer on the apoptotic cell surface, which is usually recognized by macrophages, and then inhibit effective efferocytosis.

研究分野：毒性学、分子生物学

キーワード：多層カーボンナノチューブ 好中球 エフェロサイトーシス ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNT)は、幅広い分野での応用が期待されている一方、その繊維状の微小物質であるという形体的特徴から、ヒトの健康への影響が懸念されている。事実、CNTの有害性の原因として、触媒金属、表面特性、比表面積、生体分子との相互作用、細胞膜の破壊などが挙げられている。しかしながら、現在までのところ、CNTの材料としての有害特性が明らかにされたのみであり、生体における有害発現メカニズムに関しては、依然として解明されていない。

一方、CNTの局所および全身毒性についても高い関心を集めており、中皮腫形成、肉芽腫形成等が報告されている。最近では、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラットへの吸入暴露による発がんも報告されている。興味深いことに、これら動物実験の多くでは、CNTを暴露したマウス肺胞または腹腔内での好中球の浸潤・増加が再演よく報告されている。しかしながら、いずれの報告においても、この好中球増多症様症状は1つの所見として記載されているのみであり、CNTの有害性との関連は解析されていなかった。Kaganら(Nat. Nanotechnol, 2010, 5, 354-359)の報告によると、CNTは好中球の産生するミエロペルオキシダーゼに分解されるとされる。ではなぜ、好中球の浸潤・増加が起こる状況で、発がんが起こるのか？慢性的な炎症が生じるのか？現在までのところ、好中球に対するCNTの影響に関しては知見が乏しく、十分な解が得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)暴露によって惹起される好中球増多症様症状の発症メカニズムを明らかにすることである。特に、MWCNT暴露により好中球のクリアランスが阻害され、局所的な慢性炎症が引き起こされるとの仮説を生化学的に検証する。

3. 研究の方法

(1) HL-60 細胞

HL-60細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより購入し、10% FBSを含むRPMI 1640にて培養した。好中球様細胞への分化誘導にあたっては、1.3% DMSOを含むRPMI 1640にて3日間培養することにより、好中球様HL-60細胞を得た。分化誘導の検証はCD11bを指標とし、フローサイトメーターにて実施した。

(2) 細胞内鉄量の解析

MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞をRhoNox-1にて1時間標識し、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡にて解析を行った。

(3) 細胞内活性酸素種の解析

MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞をDCFH-DAにて30分間標識し、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡にて解析を行った。

(4) カスパーゼ-3 活性の解析

ThermoFisher Scientific社製のEnzChek Caspase-3 Assay Kit #2, Z-DEVD-R110 substrateを用い、MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞のカスパーゼ-3活性を測定した。

(5) アポトーシスの解析

Promokine社製のApoptotic/Necrotic Cells Detection Kitを用い、MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞の細胞死をフローサイトメーターにより解析した。

(6) 細胞内カルシウムの定量

MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞をFluo4-AMにて1時間標識し、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡にて解析を行った。また、ミトコンドリア内のカルシウム濃度はRhod2-AMを用いて、同様に解析を行った。

(7) CD47 (Don't eat me signal) の解析

MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞をAPC-conjugated anti-human CD47にて標識後フローサイトメーターにて解析した。

(8) マクロファージによるエフェロサイトーシスの解析

MWCNTに曝露した好中球様HL-60細胞をCellTracker Greenで標識し、CellTracker Redにて標識したRAW264.7細胞と一定時間混合後、蛍光顕微鏡にて解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内鉄蓄積および細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の解析

これまでの報告によると、MWCNTの有害性の原因の1つとして、触媒鉄の影響が指摘されている。そこで、MWCNT暴露によって好中球様HL-60細胞内に蓄積した鉄量を蛍光指示薬 (RhoNox-1) により解析した。その結果、複数種類のMWCNTが好中球様HL-60細胞において過剰量の鉄の蓄積を引き起こすことが明らかとなった (図1.A)。通常、過剰な鉄の蓄積はフェントン反応によるROSの産生を引き起こす。そこで、MWCNT暴露後のROSの発生をDCFH-DAにより解析を行った。その結果、細胞内鉄の過剰蓄積を引き起こすMWCNTはROSの産生も同時に引き起こすことが明らかとなった (図1.B)。

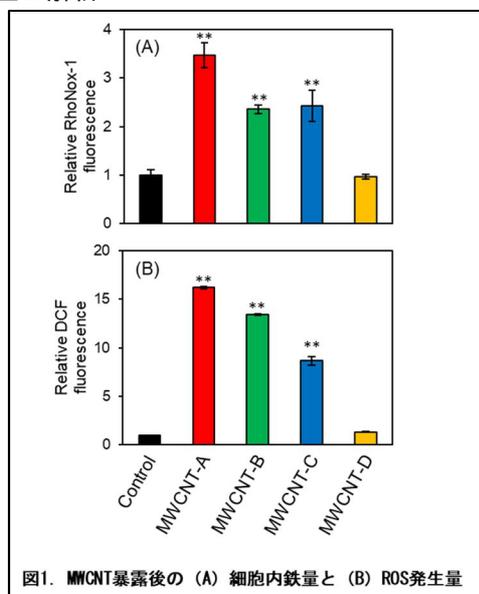


図1. MWCNT暴露後の (A) 細胞内鉄量と (B) ROS発生量

(2) カスパーゼ-3 活性の解析

次に、MWCNT暴露後のカスパーゼ-3の活性の解析を行った。その結果、細胞内の過剰鉄蓄積およびROS産生を引き起こすMWCNT-A、MWCNT-BおよびMWCNT-Cは、カスパーゼ-3の活性化を誘導し、それぞれ、2.5倍、4.4倍、4.1倍の活性上昇を引き起こした。このことから、MWCNT-A、MWCNT-BおよびMWCNT-Cは、細胞内の過剰鉄蓄積とともに、ROSの産生を引き起こし、アポトーシス経路を活性化している可能性が示唆された。興味深いことに、MWCNT-Dにおいてもカスパーゼ-3の活性上昇が認められ、その活性は、コントロールに比べ2.4倍の値を示した。このことから、MWCNT-Dに関しては、鉄の蓄積やROSの産生とは非依存的にアポトーシス経路が活性化されている可能性が考えられる。

(3) 細胞アポトーシスの解析

以上の結果より、いずれのMWCNTにおいてもカスパーゼ-3の活性化が認められたことから、好中球様HL-60がアポトーシスを起こしていることが示唆された。そこでMWCNT暴露による好中球様HL-60細胞の細胞死をフローサイトメトリーにより解析した。細胞死の検出には、FITCで標識したアネキシンおよびEthidium homodimer IIIを用いた。その結果、過剰鉄およびROS産生非依存的にカスパーゼ-3を活性化させるMWCNT-Dでは、アポトーシスを起こした細胞の割合が著しく増加しているのに対し、細胞内の過剰鉄蓄積およびROS産生を引き起こす、MWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-Cにおいては、アポトーシスを起こした細胞 (アネキシン陽性細胞) の増大は認められなかった (図2)。

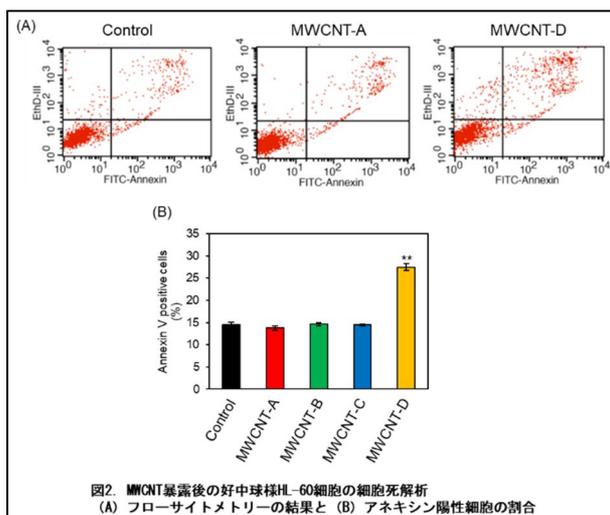


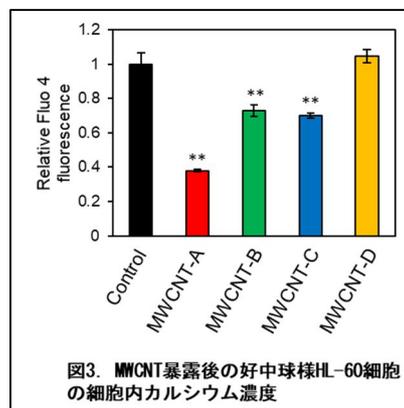
図2. MWCNT暴露後の好中球様HL-60細胞の細胞死解析 (A) フローサイトメトリーの結果と (B) アネキシン陽性細胞の割合

通常、アポトーシスを起こした細胞では、細胞外にホスファチジルセリンが露出し、これをアネキシンが認識し、フローサイトメーターによる検出が可能となる。上述の結果は、MWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-C曝露は、好中球様HL-60細胞のアポトーシスを誘導することはない、もしくは、カスパーゼ-3活性化に見られるように、アポトーシスを誘導するものの、ホスファチジルセリンの細胞外露出が阻害されているものと考えられた。

(4) 細胞内カルシウムの定量

ROS産生やカスパーゼ-3活性化に伴い誘導されるアポトーシスにおいては、細胞外へのホスファチジルセリンの露出が起こる。このホスファチジルセリンの細胞外への露出は細胞内カルシウム濃度に依存したフリッパーゼ活性により制御されている (Vallabhapurapu et al., Oncotarget, 2015, 6, 34375-34388)。細胞内のカルシウム濃度が高い場合は、低フリッパーゼ活性のため、細胞外へのホスファチジルセリンの露出が起こり、一方、細胞内のカルシウム濃度が低い場合は、高フリッパーゼ活性のため細胞外へのホスファチジルセリンの露出が抑えられる。そこで、MWCNT暴露が好中球様HL-60細胞の細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響を解析するため、カルシウム指示薬 (Fluo-4) を用いて、検証を行った。その結果、細胞外へのホスファチ

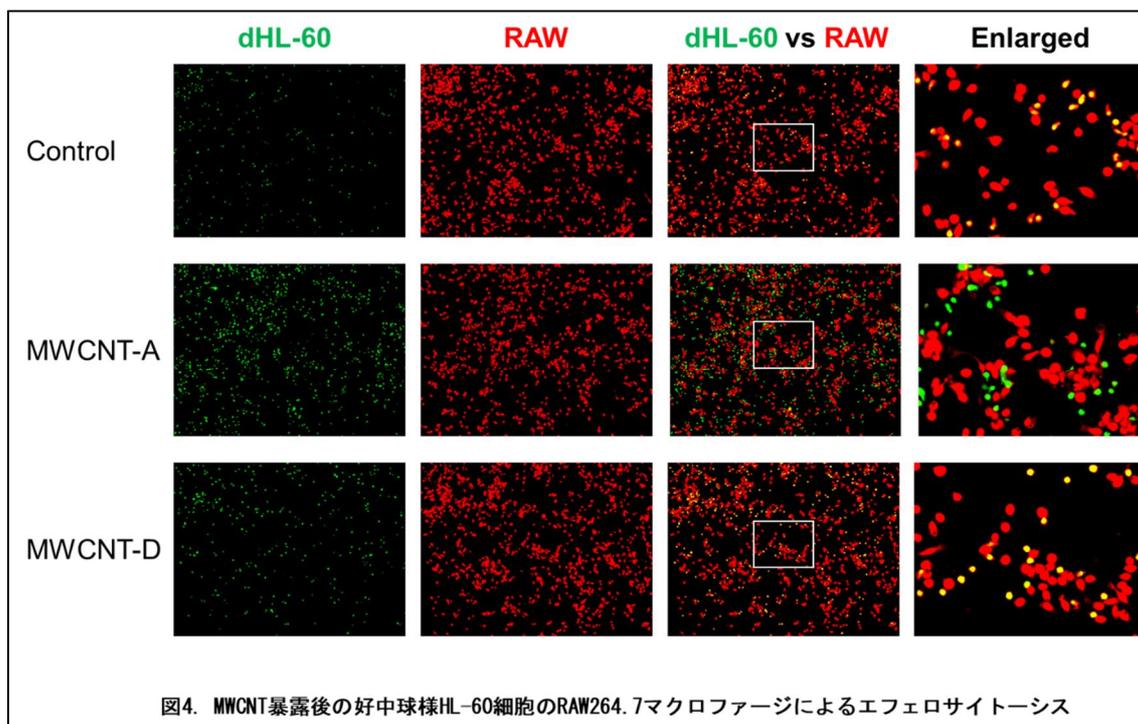
ジルセリンの露出が認められないMWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-Cを暴露した好中球様HL-60細胞においては、細胞内カルシウムが大きく減少することが明らかとなった(図3)。また、ミトコンドリア内のカルシウム濃度をRhod2により検証したところ、同様に20%から60%程のカルシウム濃度の低下が認められた。このことから、MWCNT-A、MWCNT-BおよびMWCNT-Cを暴露した好中球様HL-60細胞においては、細胞内のカルシウム濃度が低下し、フリッパーゼ活性が高く維持されるために、ホスファチジルセリンの細胞外露出が抑制されている可能性が示唆された。



(5) マクロファージによるエフェロサイトーシスの検証

生体内においてアポトーシスを起こした細胞はマクロファージによるエフェロサイトーシスによって効率的に除去される。特に、好中球が細胞表面に提示するホスファチジルセリン(Eat me signalと呼ばれる)および、CD47(Don't eat me signalと呼ばれる)は、マクロファージに認識され、貪食の促進・回避、さらには生体恒常性の維持に必要な不可欠とされる。そこで、MWCNTを暴露した好中球様HL-60細胞の細胞膜表面に発現しているCD47の発現量について解析を行った。その結果、いずれのMWCNTを暴露した好中球様HL-60細胞においてもCD47の発現量の低下が認められた(MWCNT-A:75%、MWCNT-B:60%、MWCNT-C:55%、MWCNT-D:50%)。このことから、MWCNTを暴露した好中球様HL-60細胞はDon't eat me signalであるCD47の発現低下に見られるように、アポトーシス経路が活性化されており、エフェロサイトーシスによる除去作用を受ける状態にあることが明らかとなった。

続いて、MWCNTを暴露した好中球様HL-60細胞がマクロファージによるエフェロサイトーシスにより除去されるのか検証を行った。その結果、ホスファチジルセリンの細胞外露出を抑制するMWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-Cを処理した好中球様HL-60細胞はマクロファージによるエフェロサイトーシスを回避していることが明らかとなった(図4)。



以上の結果から、MWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-Cは好中球様HL-60細胞のアポトーシスを誘導するものの、細胞内カルシウム濃度の低下によりホスファチジルセリンの細胞外露出を抑制することで、マクロファージによる認識を回避させ、同時にマクロファージによるエフェロサイトーシスを阻害することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------