

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10453

研究課題名（和文）ビトリゲルを介した共培養系による金属酸化物ナノ粒子経皮曝露影響の新規評価系の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Novel Evaluation System for the Effect of Transdermal Exposure to Metal Oxide Nanoparticles by a Vitrigel-mediated Co-culture System

研究代表者

与五沢 真吾（Yogosawa, Shingo）

埼玉医科大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：70381936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酸化亜鉛ナノ粒子（ZnONPs）等の金属酸化物ナノ粒子（MONPs）は需要拡大の一方で、炎症誘導などの報告もある。マウスを用いた皮膚感作試験を局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標とするLLNA-BrdU法で行ったが、マウス皮膚へのZnONPs塗布の影響は見出されなかった。培養細胞を用いた実験系では、ZnONPsの曝露による細胞老化誘導に伴い、インターロイキン8及びブレオマイシン水解酵素の発現低下を見出した。動物実験を行うと、これらの有意な発現低下は観察されなかったが、角質の肥厚傾向がみられた。また、MONPsのin vitro評価系構築のための基礎データが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

利用が年々高まっている酸化亜鉛ナノ粒子の曝露影響について、in vivo、in vitro両面からの基礎データを示すことができた。特にヒトの角化細胞由来HaCaT細胞と免疫反応が樹状細胞と同等といわれるTHP-1細胞を共培養した際にIL-8の誘導増強がみられるというデータは細胞老化誘導による攪乱の可能性を示す新しい知見である。酸化亜鉛ナノ粒子のような金属ナノ粒子は大変有望な物質材料であり、現在も改良・開発が進んでいる。本研究のさらなる進展により、安全性の高い高機能物質の開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：While demand for metal oxide nanoparticles (MONPs) such as zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) is increasing, there have been reports of inflammation induction. Skin sensitization studies using mice were conducted using the LLNA-BrdU method with cell proliferation response in local lymph nodes as an indicator, but the effect of ZnONPs application to mouse skin was not significant. In in vitro studies, we found decreased expression of interleukin-8 and bleomycin hydrolase in response to induction of cellular senescence by exposure to ZnONPs. In mouse model experiments, no significant decrease in expression of involucrin or bleomycin hydrolase was observed, but a tendency toward keratin thickening was observed. In addition, important basic data for the construction of an in vitro evaluation system for MONPs was obtained.

研究分野：予防医学

キーワード：金属酸化物 ナノ粒子 細胞老化

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化亜鉛、酸化アルミニウム、酸化チタンなどの金属酸化物ナノ粒子(Metal oxide nanoparticles, MONPs)は化粧品として高機能を有し、UV カットニーズを背景に需要が拡大している。しかし、MONPs に直接曝露された細胞は酸化ストレス、アポトーシス、炎症の誘導が報告されている(産業医学ジャーナル 37, 2014、同 42, 2019、など)。このような細胞レベルの研究は、培養系に直接 MONPs を添加して行われている。だが MONPs は不溶性で、凝集して 100~200nm の二次粒子径を呈し、経皮曝露ではほとんどが角質層にとどまり、細胞毒性を生じないとする考え方があつた。一方で、一部は毛孔や汗腺のような細孔部や傷口に蓄積し、そこから侵入する可能性が指摘されている。皮膚における免疫は角質層を形成する角化細胞や、抗原を認識するとリンパ節に移動して T 細胞に抗原提示を行うランゲルハンス細胞などが担っている。角質層直下の角化細胞がたとえ一部でも MONPs に直接曝露されたら、サイトカインやエクソソームなどのメッセージ物質が放出されてランゲルハンス細胞などに働いて皮膚の免疫機構が攪乱される可能性もある。しかしこのような MONPs の二次的な影響はまだほとんど研究されておらず、その評価系もない。

2. 研究の目的

研究当初は、MONPs の直接的な曝露影響ではなく、その細胞が MONPs と直接接触する機会のない細胞に対してどのように情報を伝達し、どの程度の影響を与えているのかを解明することを目的とし、そのための評価系として、MONPs を直接曝露する一次細胞(ヒト角化細胞 HaCaT)と、その影響を検討する二次細胞(ヒト単球由来細胞 THP-1: 皮膚感作性物質を曝露した際の応答が樹状細胞と同様で、皮膚感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test (h-CLAT)に使用されている)をカラーゲンビトリゲル膜で仕切って MONPs が直接接触できないようにして共培養させる実験系を確立したいと考えた。しかし、私の所属していた研究室の専任教授より、そのような二次的な影響を調べる in vitro 系を確立するよりも、動物実験を行うべきだと意見され、MONPs をマウスの皮膚に塗布した場合の影響を調べるようになった。

3. 研究の方法

MONPs として、酸化亜鉛ナノ粒子(ZnONPs)を用いることにした。ZnONPs として酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO-650(住友大阪セメント)、一時粒子径 20-30nm)を用いた。

マウス皮膚への ZnONPs の塗布の影響(局所リンパ節増殖試験)

動物実験で ZnONPs を皮膚に塗布した場合の影響を調べることになり、皮膚感作試験法として現在広く用いられている局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標とし、non-RI で行える LLNA-BrdU 法で検討することにした。従来、皮膚反応を肉眼で判定する Guinea Pig Maximization Test (GPMT 法)や Buehler Test が行われてきたが、LLNA は初回抗原刺激によるリンパ球の増殖を BrdU の取り込み量を指標として測定するため、より客観的であり、試験動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減という点でも意義があるとされる。陽性対照としてはパラフェニルジアミン(PPD)0.5%を用いた。基剤は 70%DMSO とし、ZnONPs はマイクロピペットで何とか吸える粘性になった 12.5%とした。無処理、SIAM(70%DMSO)、12.5%ZnONPs、0.5%PPD、PPD+ZnO の 5 群に分けて 3 日間耳介への塗布を行なった。塗布は、午前中に PPD または DMSO を、午後には ZnO または DMSO を塗布するという方法をとった。1 日休ませてから BrdU 10mg/ml を 0.5ml/匹 i.p. し、24 時間後に耳介リンパ節を摘出した。摘出したリンパ節は生理食塩水 0.3ml/匹を加え、ペレットペッスルでつぶしてリンパ球を分散させ、ストレーナーで濾して 15ml にメスアップし浮遊液を作成。96 穴プレート中の 3 穴に、それぞれ 0.1ml を分注し(ブランクとして 3 ウェルに生理食塩水)、Merk 社の Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit を用いて ELISA を行った。プレート毎に Blank ウェルの平均吸光度を全測定値から差し引いた後、測定波長の吸光度から参照波長の吸光度を差し引いた数値を試料吸光度※とし、溶媒対照群を 1 として stimulation index を算出した。※試料吸光度 = (測定波長吸光度 370nm - Blank 吸光度 370nm) - (参照波長吸光度 492nm - Blank 吸光度 492nm) マウスは C57BL と、C57BL よりも感度が高いとされる(Toxicology 146 (2000) 221-7) CBA 系統のマウス、CBA/J を用いて行った。

HaCaT、THP-1 共培養時の ZnONPs 曝露の影響(IL-8 測定、増殖抑制効果)

これまでに、HaCaT 細胞に ZnONPs を曝露させると細胞老化が誘導されることを見出した。細胞老化が誘導されると Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) 因子が放出されるが、その中に IL-8 が含まれるといわれている。ZnONPs の HaCaT への曝露で IL-8 が放出されるという報告は見つからなかったが、ヒト気管支上皮細胞では IL-8 を誘導するという報告があつた(Cell Biol Toxicol. 2014 Apr;30(2):79-88.、Environ Health Perspect. 2010 Jul;118(7):982-7)。また、共培養系で二次細胞として用いる予定の THP-1 については、ZnONPs ではないが、DNCB(2,4-ジニトロクロロベンゼン)などの皮膚感作物質で刺激すると、IL-8 放出

を促すという報告(Toxicology in Vitro 30, 2015)があった。さらに、HaCaT と THP-1 を共培養すると、より in vivo に近い形で皮膚感作性試験結果が得られたという報告(ALTEX 36(4), 2019)もあった。

そこで、HaCaT と THP-1 の共培養系において、ZnONPs 曝露で培地中に IL-8 が放出されるのか調べた。HaCaT をコンフルエントになるまで培養(96 ウェルプレート)後、培地を除き、THP-1 を重層(8×10⁵ cells/ml)し、さらに ZnONPs を添加した。2 日後、培養上清中の IL-8 を uncoated ELISA kit #88-8086-88 (Invitrogen) を用いて ELISA にて測定した。また、浮遊している THP-1 を含む培養上清を別のプレートに移し、WST-8 アッセイによる増殖測定も行った。

ブレオマイシン水解酵素(BMLH)の発現

ZnONPs の曝露で細胞老化誘導と IL-8 分泌の促進が観察された。動物実験のレベルで老化と IL-8 に関する知見について検索すると、老化によりリンパ管の機能が低下して IL-8 が蓄積、その IL-8 が細胞老化を促進し、細胞老化に関係して表皮中の保水性を保つ NMF の生成に関与するブレオマイシン水解酵素(BMLH)の発現を低下させるという報告(資生堂、2021 年日本研究皮膚学会)があった。そこで、ZnONPs を曝露させた HaCaT 中の BMLH 発現の変化を、抗 BMLH 抗体を用いて間接蛍光抗体法とイムノブロットング法で観察した。さらに、BMLH 発現変化が in vivo でもみられるかどうか、マウス皮膚へ ZnONPs を塗布して動物実験も行った。塗布は「産業化学物質のマウス経皮ばく露方法の検討」(労働安全衛生研究 2019;12(3):195-8.)に従い、マウスの背中を電気バリカンで剃毛し、70%DMSO を基剤として塗布した。塗布面はリント布、ポリウレタンフィルム、伸縮包帯をまいて保護して 5 日間経過の後、皮膚を切り出し、免疫組織化学的染色を行って観察した。

ZnONPs 曝露時の THP-1 活性化指標(CD56、CD84)に対する影響

ZnONPs を直接曝露する一次細胞(ヒト角化細胞 HaCaT)と、その影響を検討する二次細胞(ヒト単球由来細胞 THP-1: 皮膚感作性物質を曝露した際の応答が樹状細胞と同様で、皮膚感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test (h-CLAT)に使用されている)をカラーゲンビトリゲル膜で仕切って共培養させる実験系を確立する際に、一次細胞のある上層に加えた ZnONPs が下層に漏れ出して直接二次細胞を活性化させてしまう可能性を排除しなくてはならない。そこで、二次細胞に用いる THP-1 については、培養細胞による皮膚感作性試験、human Cell Line Activation Test (h-CLAT)において、活性化指標として表面抗原、CD54・CD86 の発現上昇が用いられている。そこで THP-1 に ZnONPs を直接曝露させ、CD54・CD86 の発現に及ぼす影響について間接蛍光抗体法により調べた。

4. 研究成果

マウス皮膚への ZnONPs の塗布の影響(局所リンパ節増殖試験)

C57BL を用いた実験では、ポジティブコントロールの PPD 処理群でも有意差は出なかった。そこで、C57BL よりも感度が高いとされる CBA/J を用いて行くと、PPD 処理群で有意差がみられたが、ZnO 処理群ではみられなかった(Dunnet 検定、図 1)。体重推移、摘出した次回リンパ節重量についても有意な変化は見られなかった(図 1)。

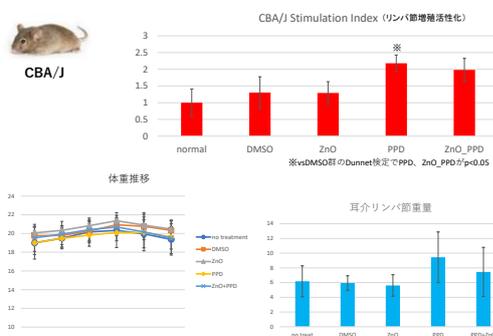


図 1 CBA/J を用いた局所リンパ節増殖試験結果

HaCaT、THP-1 共培養時の ZnONPs 曝露の影響(IL-8 測定、増殖抑制効果)

HaCaT 細胞と THP-1 細胞に ZnONPs を曝露させると、IL-8 が誘導されること、さらに、これらの共培養により、IL-8 の発現量が増強されることを ELISA で確認できた(図 2)。IL-8 は老化細胞が分泌する SASP 因子に IL-8 が含まれるといわれていることから、細胞老化と関係が深いと考えられる。また、IL-8 は ROS (活性酸素種) により発現誘導されることが知られているが、これまでの研究で ZnONPs により細胞内 ROS が蓄積されることを既に報告しており(Mutat Res Genet Toxicicol Environ Mutagen. 834, 25-34, 2018)、矛盾しない結果であると考えられる。

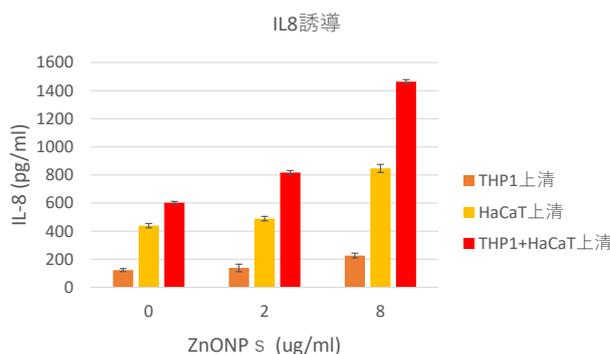


図 2 ZnONPs 曝露による IL-8 誘導

また、共培養により THP-1 の細胞数が減少ことも見出した (図 3)。HaCaT と共培養しているだけで 70%程度まで抑制され、単独培養では ZnONPs 20ug/ml では増殖抑制効果がみられないのだが、HaCaT と共培養していると抑制がかかる様子が観察された。HaCaT と THP-1 の間で何らかの相互作用があると考えられ、共培養の意義を考える上で大変興味深い結果であった。

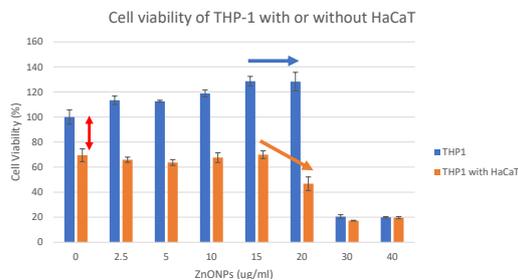


図 3 共培養による THP-1 の増殖抑制

ブレオマイシン水解酵素(BMLH)の発現低下

皮膚において天然保湿因子 (NMF) を産生するブレオマイシン水解酵素 (BMLH) は、皮膚バリア機能に重要な役割を果たしている。老化に伴い BMLH が減少するという報告があった (資生堂、2021 年日本研究皮膚学会) ので、ZnONPs で HaCaT に老化が誘導される際に発現が変化するかどうか免疫ブロットング法と間接蛍光抗体法で調べた (図 4)。BMLH の発現低下は免疫ブロットング法でも間接蛍光抗体法でも観察された。これまで、

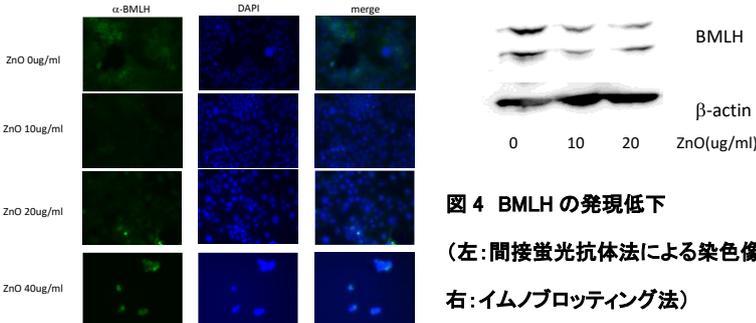


図 4 BMLH の発現低下

(左:間接蛍光抗体法による染色像、右:免疫ブロットング法)

ZnONPs 曝露によって分化誘導が確認され、その際にコーニファイドエンベロープの構成成分であるインボルクリンの発現が増強することから、皮膚バリア機能は向上する可能性を考えていたが、本データからは、NMF 産生が抑制され保湿機能が低下し、皮膚バリア機能を悪化させる可能性が考えられた。つまり ZnONPs は、皮膚バリア機能に対して正にも負にも影響しうる可能性が示唆された。

そこで、動物実験を行った。マウスの背中に ZnONPs を塗布し、インボルクリンや BMLH の発現を免疫組織化学的に観察した。ZnONPs 塗布群で角層が厚くなり、顆粒層で BMLH の発現がやや上昇している (図 5 矢印) などの傾向がみられたが、顕著な変化ではなかった (図 5)。

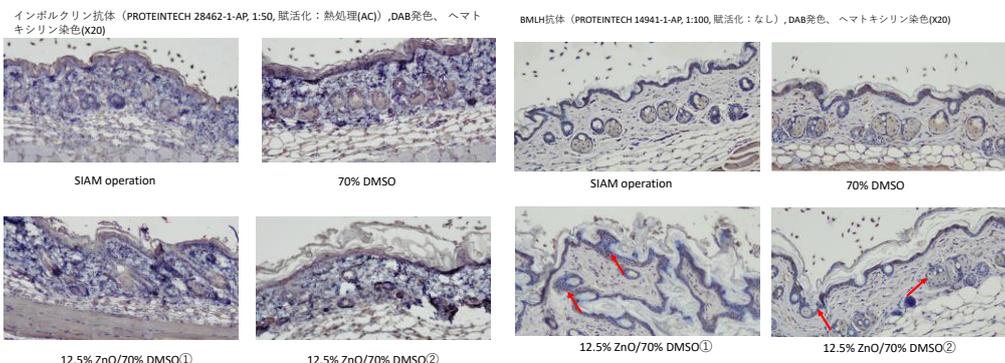


図 5 マウス皮膚への ZnONPs 塗布によるインボルクリン(左)、BMLH(右)への影響(組織免疫染色像)

ZnONPs 曝露時の THP-1 活性化指標 (CD56、CD84) に対する影響

THP-1 は皮膚感作性物質を曝露した際の応答が樹状細胞と同様で、皮膚感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test (h-CLAT)) に使用されている。h-CLAT でマクロファージの活性化指標に用いられている CD54・CD86 発現について、ZnONPs の直接ばく露による影響を調べたところ、発現増強は確認できなかった (図 6)。このことから、一次細胞 (ヒト角化細胞 HaCaT) と、その影響を検討する二次細胞 (THP-1) をコラーゲンビトリゲル膜で仕切って共培養させる際に、一次細胞のある上層に加えた ZnONPs が下層に漏れ出して直接二次細胞を活性化させてしまう可能性を排除できたと考えられる。

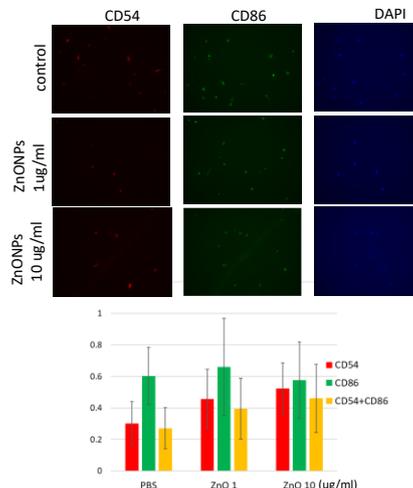


図 6 THP-1 における活性化指標の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 与五沢真吾、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 ヒト皮膚角化細胞の酸化亜鉛ナノ粒子曝露によるプレオマイシン水解酵素の発現低下
3. 学会等名 第95回日本産業衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 与五沢真吾、岩本武夫、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 酸化亜鉛ナノ粒子曝露によるヒト皮膚角化細胞の細胞老化に伴うIL-8誘導
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 与五沢真吾、岩本武夫、柳澤裕之
2. 発表標題 ヒト皮膚角化細胞HaCaTに対する酸化亜鉛ナノ粒子の曝露影響
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大導寺清世、与五沢真吾、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 ヒト角化細胞由来HaCaTと共培養することで引き起こされる、ヒト単球由来THP-1のアポトーシス誘導
3. 学会等名 第138回成医会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須賀 万智、木戸 尊將、吉岡 亘、与五沢 真吾、山内 貴史、蜂須賀 英梨、大越 裕人、関 良子、菅谷 ちえ美、羽野 寛、岡野 孝、横山 昌幸、柳澤 裕之
2. 発表標題 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物取扱作業者に発生した呼吸器疾患に関する検討
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 与五沢真吾、岩本武夫、柳澤裕之
2. 発表標題 ヒト皮膚角化細胞HaCaTに対する酸化亜鉛ナノ粒子の曝露影響
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 与五沢真吾、須賀万智、柳澤裕之
2. 発表標題 酸化亜鉛ナノ粒子曝露によるヒト皮膚角化細胞の分化誘導と細胞老化
3. 学会等名 オール埼玉医大研究の日2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京慈恵会医科大学環境保健医学講座ホームページ https://plaza.umin.ac.jp/~jikphem/ 埼玉医科大学保健医療学部ホームページ https://www.saitama-med.ac.jp/hoken/</p>
--

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