

## 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 6月14日現在

機関番号：32660  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23651055  
 研究課題名（和文）ATP・ATP受容体シグナルを介したナノ粒子暴露細胞での活性酸素  
 産生機構の解明  
 研究課題名（英文）Investigation of mechanisms of radical oxygen species (ROS) via  
 ATP・ATP receptor signaling in the cells exposed to nanoparticles  
 研究代表者  
 小島 周二 (KOJIMA SHUJI)  
 東京理科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：90119579

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：マウス腎メサンギウム細胞に粒子径 30、70、  
 及び 300 nmのナノシリカ粒子（各々、nSP30、nSP70、及び nSP300）を暴露し、ATP・ATP  
 受容体シグナリングを介した活性酸素産生（ROS）産生機構を検討した。その結果、nSP30 と  
 nSP70 のシリカ粒子で有意な細胞からの ATP 放出、Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入、および ROS 産生がみ  
 られ、ATP分解酵素（apyrase）処理によりこれらの現象が抑制された事から、ナノ粒子による ROS  
 産生に ATP・ATP 受容体シグナリングの関与が示唆された。さらに、ヒト皮膚上皮 HaCaT 細  
 胞でもほぼ同様な結果を得た。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of ROS production via ATP-ATP signaling was examined  
 in the mouse kidney mesangium cells exposed to nano-silica particles with 30, 70,  
 and 300nm of diameter (nSP30, nSP70, and nSP300, respectively). As a result, the  
 significant ATP release, Ca<sup>2+</sup> influx and ROS production were observed in the cells exposed  
 to nSP30 and nSP70. These events were blocked by the treatment with ecto-nucleotidase  
 apyrase, suggesting involvement of ATP・ATP receptor signaling in nSP-induced ROS  
 production. Furthermore, the same results were obtained in human keratinocytes, HaCaT  
 cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計			3,900,000

研究分野：放射科学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：ナノ粒子、活性酸素、環境科学、ATP受容体、細胞毒

## 1. 研究開始当初の背景

大気中に浮遊し存在する粒状物質の生体影響に関しては、これまで疫学的並びに基礎的研究がなされており、呼吸器系あるいは循環系に対する障害が報告されている。また、その主因としてナノ粒子であろうとする推測がなされている。ナノ粒子/材料に関しては、古くはジーゼル排ガス中に含まれる物質 (DEP)、アスベスト、さらに最近ではナノテクノロジー産業によりカーボンブラック、フラーレン、酸化チタンなどの種々のナノ粒子/材料が開発され、すでに化粧品や光触媒として産業利用されている。しかしながら、これらの利用に関しては解決されなければならない問題も多々存在すると思われる。その中の一つに、ROS の放出を介して生体に様々な悪影響を及ぼすという問題があるが、この産生機構は不明である。DEP をはじめとし多くのナノ粒子に共通する特性として、「活性酸素 (ROS) 産生による酸化ストレス」がこれまで報告されているが、その機構は不明である。ごく最近 Bhabra らは (Bhabra et al., 2009, Nature nanotechnology)、COCr ナノ粒子による DNA 障害が COCr 自身によるものでなく、暴露された細胞から放出された ATP 等のプリンクレオチドによる二次的作用の結果生ずるのであると言う極めて注目すべき報告をしているが、その後今日まで、二次的現象としての ROS 産生に関する報告は未だなされていない。

## 2. 研究の目的

これまで、DEP をはじめとし多くのナノ粒子に共通する特性として「ROS 産生による酸化ストレス」が報告されているが、その機構については不明である。そこで本研究ではナノシリカ粒子 (以下、nSP) を取り上げ、ATPATP シグナリングを介した ROS 産生機構を明らか

かにする。

## 3. 研究の方法

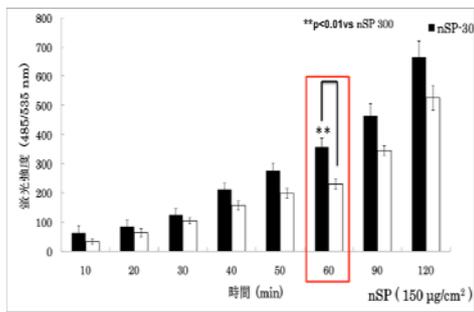
- 1) ナノシリカ粒子 (nSP) 暴露によるマウス腎メサングウム細胞 (mMC) での ATP 放出と活性酸素 (ROS) 産生に関する検討
  - ① 粒経の異なる nSP による mMC からの ATP 放出とその経路の同定  
粒径 30、70、及び 300 nm の nSP (各々、nSP30、nSP70 及び nSP300) を mMC に暴露後、細胞外への ATP 放出を詳細に検討する。さらに、いずれの経路を介して ATP が放出されるのかを、種々のチャンネル等阻害薬を用いて推定する。
  - ② 粒経の異なる nSP による mMC からの ROS 産生と ATP 分解酵素 (apyrase) 処理による抑制  
上記粒子経の各ナノ粒子による mMC での ROS 産生量を蛍光指示薬 DCF を用いて測定し、ATP 放出量との相関性を検討する。さらに、この誘導が ATP 分解酵素 (apyrase) の前処理によって抑制されることから、ROS 産生での ATP の関与を確認する。
  - ③ mMC での nSP 及び ATP による ROS 産生に関与する受容体の同定  
ATP 放出後の ROS 産生に関与する受容体を推定する目的で、まずはじめに mMC で発現するプリン受容体 mRNA を RT-PCR 法により同定する。次に、nSP 及び ATP による ROS 産生誘導に関与する受容体を各受容体アンタゴニストを用いて推定する。
- 2) ナノシリカ粒子 (nSP) 暴露によるヒトケラチノサイト HaCaT 細胞での ATP 放出と活性酸素 (ROS) 産生に関する検討

マウス腎メサンギウム細胞で得られた結果を HaCaT 細胞で確認する。

#### 4. 研究成果

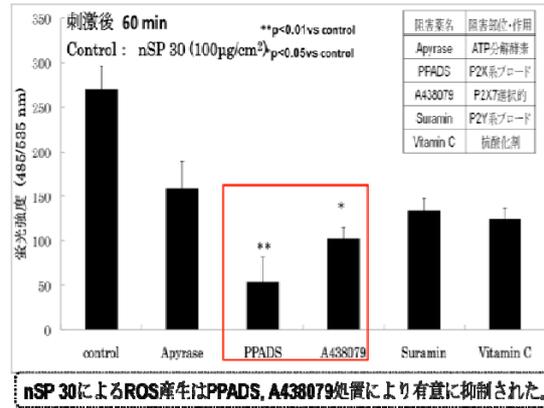
##### 1) ナノシリカ粒子 (nSP) 暴露によるマウス腎メサンギウム細胞 (mMC) での ATP 放出と活性酸素 (ROS) 産生に関する検討

DEPをはじめとし多くのナノ粒子に共通する特性として「生体内での ROS 産生」が報告されているが、その機序は不明である。そこで、本研究では粒径の異なる 3 種のシリカナノ粒子を取り上げ、マウス腎メサンギウム細胞で ATP・ATP受容体シグナリングを介した ROS 産生機構を検討した。その結果、図 1 & 2 に示す様に、粒径 30nm のシリカナノ粒子で有意な細胞からの ATP 放出、 $Ca^{2+}$  の細胞内流入、および活性酸素産生がみられ、これらの現象に ATP・ATP受容体 (P2X7) シグナリングの関与が示唆された (図 3)。



nSP 暴露後 60分で有意にROS産生量が増大した。

図 1 マウス腎メサンギウム細胞 (mMC) での nSP による ROS 産生



nSP 30によるROS産生はPPADS, A438079処置により有意に抑制された。

図 2 P2 受容体阻害剤のROS産生に対する効果

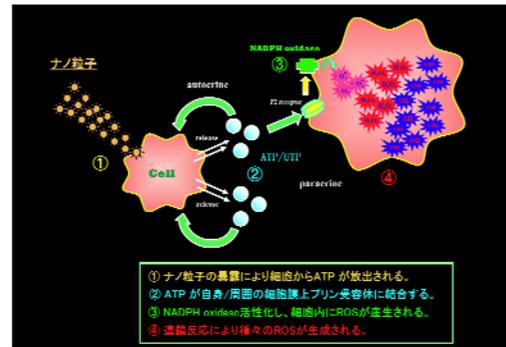


図 3 ATP・ATP受容体 (P2X7) シグナリングを介した ROS 産生

##### 2) ナノシリカ粒子 (nSP) 暴露によるヒトケラチノサイト HaCaT 細胞での ATP 放出と活性酸素 (ROS) 産生に関する検討

ナノシリカ粒子 (nSP) により誘導される ATP シグナリングを最も細胞傷害性が大きい粒径 30 nm の nSP30 について HaCaT 細胞を用いて検討した。nSP30 を細胞に暴露すると、細胞外に ATP が有意に放出され、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度と p38 MAPK 活性の上昇がみられた、最終的にはアポトーシスに至った。これらの変化は nSP による ATP 分解酵素である apyrase 処理により抑制された。

以上、nSP30 暴露により ATP 放出、その後の P2 受容体 (P2X7) の活性化を介した ROS 産生が細胞死に繋がるという新規メカニズムが見いだされた。

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)

[学会発表] (計4件)

- 1) 長倉千尋、月本光俊、小島周二 ; ナノシリカ粒子により誘導される ATP シグナリングの解析 ; 第56日本薬学会関東支部大会 (東京 2012年10月)
- 2) 根岸祐介、月本光俊、小島周二 ; 肝クッパー細胞に対するナノ粒子の生物影響 ; 第56日本薬学会関東支部大会 (東京 2012年10月)
- 3) 根岸祐介、月本光俊、武之内敬人、木谷裕、原田均、武田健、小島周二 ;

#### Purinergic

signaling を介したクッパー細胞でのナノシリカ粒子による IL-1 $\beta$  の誘導 ;  
フォーラム2012 衛生薬学環境・トキシコロジー (名古屋 2012年10月)

- 4) 長倉千尋、月本光俊、小島周二 ; ナノシリカ粒子により誘導される ATP シグナリング ; 日本薬学会第133年会 (横浜 2013年3月)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
小島周二 (KOJIMA SHUJI)  
東京理科大学薬学部教授  
研究者番号 : 90119579

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号 :