

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460798

研究課題名(和文) ナノ粒子による炎症反応誘導機構の解明と炎症性疾患のリスク評価法の開発

研究課題名(英文) Study of mechanisms for nanoparticle-induced inflammation and the development of safety evaluation methods for inflammation-related diseases.

研究代表者

及川 佐枝子(多田佐枝子)(Tada-Oikawa, Saeko)

椋山女学園大学・生活科学部・講師

研究者番号：90610585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年化粧品や食品などに広く利用されている二酸化チタンや酸化亜鉛のナノ粒子について、THP-1マクロファージ様細胞および大腸癌細胞Caco2を用いて炎症反応の誘導および炎症性疾患増悪作用の検討を行った。その結果、二酸化チタンのナノ粒子による炎症反応誘導作用は、ルチル型よりアナターゼ型で強く認められた。

また、THP-1マクロファージ様細胞において、酸化亜鉛のナノ粒子により粥状動脈硬化進行の原因とされるマクロファージ泡沫化の促進が認められたが、二酸化チタンのナノ粒子では認められなかった。酸化亜鉛ナノ粒子はマクロファージの泡沫化を促進し、粥状動脈硬化症を増悪する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to determine the effects of five TiO<sub>2</sub> particles of different crystal structures and sizes in human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells and THP-1 monocyte-derived macrophages. Exposure of THP-1 macrophages to 50 μg/mL of anatase (50nm) TiO<sub>2</sub> particles increased IL-1 expression level, and exposure of Caco-2 cells to 50 μg/mL of anatase (50nm) TiO<sub>2</sub> particles also increased IL-8 expression. The results indicated that anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles induced inflammatory responses compared with other types of TiO<sub>2</sub> particles.

Moreover, we found that exposure to ZnO particles increased macrophage cholesterol uptake, which was mediated by an upregulation of membrane scavenger receptors of modified LDL. The results suggested that nanosized ZnO particles could potentially enhance atherosclerogenesis and accelerate foam cell formation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ナノ粒子 炎症反応 二酸化チタン 酸化亜鉛 IL-1 IL-8 スカベンジャーレセプター

## 1. 研究開始当初の背景

近年、二酸化チタンや酸化亜鉛、シリカなどのナノ材料は、化粧品や医薬品、食品添加物などの用途として広く利用されている。その一方で、ナノ材料は表面積が大きいことから粒子そのものの表面性状が毒性に関連しており、酸化ストレスや炎症反応を惹起すると指摘されている (Nel, *Nat Mater*, 2009)。炎症反応が持続すると、炎症性腸疾患や炎症関連発がん、動脈硬化など、様々な炎症性の疾患が引き起こされる。

マクロファージは、病原体などの異物に対する最初の応答システムとして炎症反応を誘導する。これまでに、二酸化チタン、シリカのナノ粒子曝露によりマクロファージにおいて炎症性サイトカインの産生、活性酸素 (ROS) および一酸化窒素 (NO) の増加が報告されている (Park, *Toxicology Let*, 2009; Nemmar, *Exp Biol Med*, 2007)。しかし、ナノ粒子の詳細な炎症反応誘導機構は未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究では、ナノ粒子の炎症反応の誘導機構を解明するため、二酸化チタンや酸化亜鉛のナノ粒子についてヒト単球細胞 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激しマクロファージ様に分化させた細胞およびヒト大腸癌細胞 Caco-2 を用いて、活性酸素 (ROS) や炎症性サイトカイン (インターロイキン (IL) -1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  など) の産生、さらに、NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) インフラマソームや nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) などの炎症関連因子の発現を解析する。
- (2) 空気中に浮遊するナノ粒子は、吸入により取り込まれた後肺胞にまで達し、肺循環により心血管系に移行すると考えられている。ナノ粒子による心血管系に対する影響が懸念されるが、その詳細は不明である。粥状動脈硬化の発生過程では、

変性 LDL を取り込み泡沫化したマクロファージが動脈壁内で崩壊し、変性 LDL が細胞間に放出されるに伴い粥腫が形成される。本研究では、酸化金属 (二酸化チタン、酸化亜鉛) のナノ粒子のマクロファージ泡沫化に対する影響について検討を行う。

- (3) ナノ粒子による炎症性疾患の誘導・増悪作用を解明するため、炎症性腸疾患モデルマウスに二酸化チタン、酸化亜鉛、シリカのナノ粒子を経口投与し、大腸炎の増悪作用を解析する。

## 3. 研究の方法

- (1) ナノ粒子は、その種類と溶媒によって様々な凝集パターンを形成することから、各実験に用いるナノ粒子の分散状態を評価する必要がある。ナノ粒子を溶媒 (培地) に添加した後、超音波破碎装置 (Branson 社, Sonifier model 450) を用いて分散し、粒度分布測定を Zetasizer Nano Z (Malvern 社) を用いて、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering : DLS) により行った。
- (2) THP-1 マクロファージ様細胞および Caco-2 に種々の結晶型、粒子径の二酸化チタン粒子 (アナターゼ型、A50 (50nm), A100 (100nm); ルチル型、R50 (50nm), R250 (250nm); 80%アナターゼ / 20%ルチル、P25 (21nm)) を曝露し、活性酸素種 (ROS) の産生を検出プローブ、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) を使用し、フローサイトメーター (FACS Canto II, BD Biosciences) により解析した。また、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により培養上清における炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) の産生を測定した。さらに炎症関連因子、Nlrp3, NF- $\kappa$ B のタンパク質レベルでの発現をウェスタンブロット法にて、IL-8 発現の RNA レベルでの発現を RT-PCR

法にて解析した。

- (3) THP-1 を酸化亜鉛および二酸化チタンのナノ粒子（一次粒径：約 20nm）で曝露後 phorbol 12-myristate 13-acetate 刺激によりマクロファージ様に分化させ、蛍光色素 1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) で標識した変性 LDL の取り込みをフローサイトメーターにより解析した。さらに、変性 LDL の取り込みに関するスカベンジャーレセプター (CD36, SR-A) の発現を解析した。
- (4) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の飲水投与により大腸炎を誘導した炎症性腸疾患モデルマウスに、酸化亜鉛および二酸化チタン、シリカのナノ粒子溶液を経口投与し、体重および大腸の長さの減少を指標に、大腸炎の増悪を評価した。

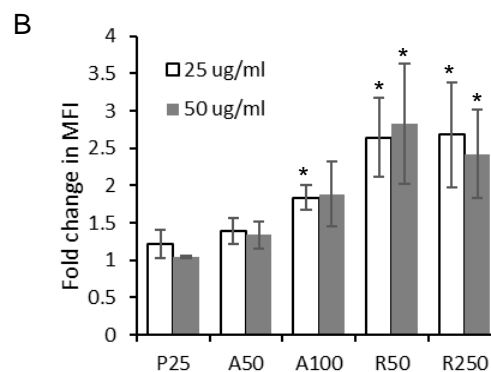
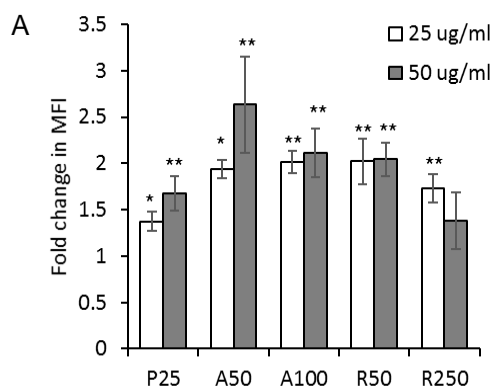
#### 4. 研究成果

- (1) 種々の二酸化チタン粒子を THP-1 マクロファージ様細胞および Caco-2 に 3 時間曝露し、ROS の産生を CM-H<sub>2</sub>DCFDA 染色によりフローサイトメーターで解析した結果、どのナノ粒子においても細胞内 ROS の産生が認められた (図 1 A, B)。一方、ELISA 法による IL-1 $\beta$  の産生 (図 2) および RT-PCR 法による IL-8 発現は、A50 のみ増加が認められた (図 3)。炎症関連因子、Nlrp3 インフラサームは THP-1 マクロファージ様細胞において、二酸化チタン粒子による有意な発現の増加は認められなかった。また、NF- $\kappa$ B の活性化 (核への移行) については、どの二酸化チタン粒子についても、THP-1 マクロファージ様細胞および Caco-2 において認められる傾向にあったが、結晶型、粒子径による差は認められなかった。さらに検討を行う必要がある。

以上より、二酸化チタンナノ粒子は、炎症反応の誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。特に、アナターゼ

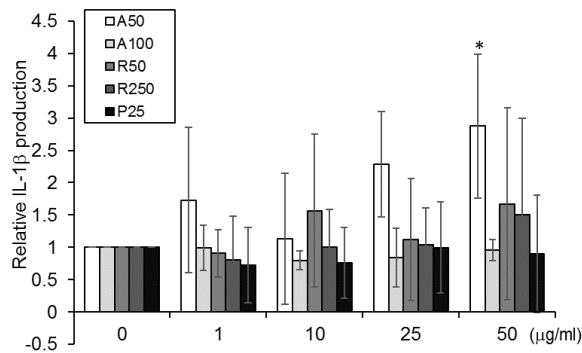
型の二酸化チタンナノ粒子が、他の二酸化チタン粒子に比べ、強い炎症反応誘導作用を持つことが示された。

- (2) ナノ粒子の THP-1 マクロファージ様細胞の泡沫化への影響を解析した結果、酸化亜鉛ナノ粒子の曝露により、THP-1 マクロファージ様細胞において変性 LDL 取り込み量の増加が認められた。一方、二酸化チタンナノ粒子では認められなかった (図 4)。また、スカベンジャーレセプターの CD36 および SR-A の発現も、酸化亜鉛ナノ粒子の曝露により増加したが、二酸化チタンナノ粒子の曝露では認められなかった。以上より、酸化亜鉛ナノ粒子はマクロファージの泡沫化を促進し、粥状動脈硬化症を増悪する可能性が示唆された。



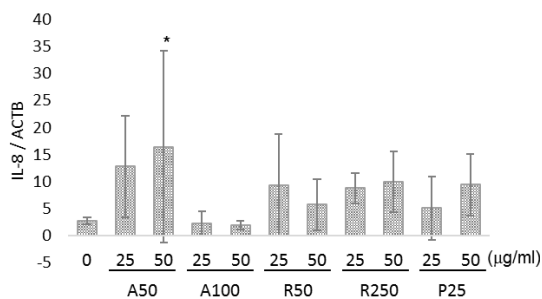
Values are means  $\pm$  SD. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ : significant differences from controls (0  $\mu$ g/ml) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test

図1 二酸化チタン粒子による (A) THP-1 マクロファージおよび (B) Caco-2 における活性酸素の産生 (3 時間曝露)



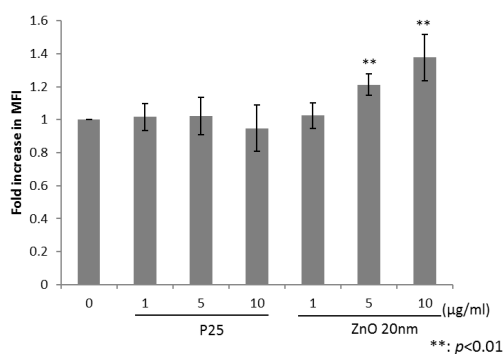
Values are means ± SD. \*, p<0.05 : significant differences from controls (0 μg/ml) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test.

図2 二酸化チタン粒子による THP-1 マクロファージにおける IL-1β の産生 (24 時間曝露)



Values are means ± SD. \*, p<0.05 : significant differences from controls (0 μg/ml) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test

図3 二酸化チタン粒子による Caco-2 における IL-8 の発現 (6 時間曝露)



Values are means ± SD. \*\*, p<0.01 : significant differences from controls (0 μg/ml) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test.

図4 酸化亜鉛、二酸化チタンナノ粒子による Ac-LDL の取り込み

(3) C57BL/6 マウスに DSS (2.5%あるいは 1.25%) の飲水投与を行い、酸化亜鉛、二酸化チタン、シリカのナノ粒子溶液を経口投与し、体重および大腸の長さの減少を指標に、大腸炎の増悪を評価した。その結果各種ナノ粒子による大腸炎の有意な増悪作用は認められなかった。今後、DSS の濃度を見直すなどの検討を行う必要があると考えられる。

## 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 5 件)

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Fukatsu H, Shimanuki Y, Tanaka N, Watanabe E, 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.* 査読有、17 巻、2016、pii: E576. DOI: 10.3390/ijms17040576

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Wu W, Yamada Y, Mishima T, Ichihara S. Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles suppresses vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. *Toxicology Reports.* 査読有、2 巻、2015、692-701. DOI:10.1016/j.toxrep.2015.04.003

Chang J, Ichihara G, Shimada Y, Tada-Oikawa S, Kuroyanagi J, Zhang B, Suzuki Y, Sehsah R, Kato M, Tanaka T, Ichihara S. Copper Oxide Nanoparticles Reduce Vasculogenesis in Transgenic Zebrafish Through Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Induction of Apoptosis. *J Nanosci Nanotechnol.* 査読有、15 巻、2015、2140-2147.

Wu W, Ichihara G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang

J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Ichihara S. Synergistic effect of bolus exposure to zinc oxide nanoparticles on bleomycin-induced secretion of pro-fibrotic cytokines without lasting fibrotic changes in murine lungs. Int J Mol Sci. 査読有、16 巻、2014、660-676.

DOI: 10.3390/ijms16010660.

Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Ichihara G, Yabata M, Izuoka K, Suzuki M, Sakai K, Ichihara S. Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. Toxicol Appl Pharmacol. 査読有、278 巻、16-25

DOI: 10.1016/j.taap.2014.04.010.

[学会発表](計 5 件)

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. SENN2015 Congress, Helsinki, Finland, 12-15 April 2015.

Yuka Suzuki, Gaku Ichihara, Saeko Tada-Oikawa, Toshihiko Murakami, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Sahoko Ichihara. Effects of nano-sized TiO<sub>2</sub> on the adhesion of monocytes to endothelial cells. 7th International Congress of Asia Society of Toxicology (ASIATOX 2015), Jeju Island, Korea, 23-26 June 2015.

Yuka Suzuki, Gaku Ichihara, Cai Zong, Saeko Tada-Oikawa, Kiyora Izuoka, Sahoko Ichihara. Single-wall or double-wall carbon nanotubes induce atherosclerosis progression in animal and culture models of atherosclerosis.

The 54rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego, California, USA, 22-26 March 2015.

鈴木悠加、市原学、及川(多田)佐枝子、村上理彦、出岡淑、市原佐保子、単球の血管内皮細胞への接着能に及ぼす酸化チタンナノ粒子の影響、第 14 回分子予防環境医学研究会、大阪市立大学医学部(大阪府大阪市)、2015 年 2 月 13-14 日  
及川(多田)佐枝子、市原学、鈴木悠加、出岡淑、三島隆、市原佐保子、酸化亜鉛ナノ粒子の血管内皮前駆細胞に対する影響、第 84 回日本衛生学会学術総会、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)、2014 年 5 月 25-27 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
及川(多田)佐枝子(TADA-OIKAWA, Saeko)  
椋山女学園大学・生活科学部管理栄養学科・講師  
研究者番号: 90610585

(2) 研究分担者  
市原学(ICHIHARA, Gaku)  
東京理科大学・薬学部薬学科・教授  
研究者番号: 90252238

(3) 連携研究者  
久保雅敬(KUBO, Masataka)  
三重大学大学院・地域イノベーション学研究科・教授  
研究者番号: 70195494