

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293149

研究課題名(和文) 外部環境ストレスによる血管系に対する影響とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation on the effects of environmental stress on the cardiovascular system

研究代表者

市原 佐保子 (ICHIHARA, Sahoko)

三重大学・地域イノベーション学研究所・准教授

研究者番号：20378326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ素材の血管系に対する影響とその障害機構を解明することを目的とし、遺伝子改変ゼブラフィッシュに酸化金属ナノ粒子を投与した結果、イオン化する酸化金属ナノ粒子が、血管形成に影響を及ぼす結果が得られた。また、血管内皮コロニー形成細胞にナノサイズとマイクロサイズの酸化亜鉛粒子を投与したところ、酸化亜鉛ナノ粒子が脈管形成に関連する受容体の発現低下を介して、脈管形成を抑制するが、これらの効果は放出された亜鉛イオンの濃度に規定されていることが確認された。動脈硬化モデル動物を使用した実験では、カーボンナノチューブは、単球の内皮細胞への接着を促進し、大動脈内腔の粥腫形成を増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We research adverse effects of the "environmental stress", including physical or chemical factors on the cardiovascular system and investigate the mechanisms underlying the effects. Now we focus on elucidation of the effects of fine particles or nanoparticles on vascular endothelial function and the mechanism of inflammation induced by particles. Our results showed that zinc oxide (ZnO) nanoparticles suppressed vasculogenesis in human endothelial colony forming cells through downregulation of the expression of receptors related to vasculogenesis. Moreover, we showed that carbon nanotubes enhanced atherosclerosis by promoting monocyte adhesion to endothelial cells using animal model of human atherosclerosis.

研究分野：環境保健学

キーワード：環境ストレス ナノ粒子 カーボンナノチューブ 動脈硬化 炎症

1. 研究開始当初の背景

環境による健康問題として、PM2.5 (微小粒子状物質) などによる環境中の粒子に加え、ナノ素材などの新規工業的素材の健康への影響に社会的関心が高まり、生体影響に関するリスク評価や環境基準値の設定が求められている。これまでに、ヒ素などの環境化学物質やナノ粒子は、中枢神経症状と同時に末梢血管障害を惹起することが報告されている。したがって、ナノ素材の動脈硬化や血管新生など循環器系システムへの影響機構を検討することは学術的に意義がある。

2. 研究の目的

本研究では、動物実験および培養細胞実験を活用し、ナノ素材の血管系に対する影響とその障害機構を解明し、外部環境ストレスによる血管系に対するリスク評価のための科学的基礎資料を作成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 工業的によく使用されている酸化金属ナノ粒子 (酸化チタン・酸化銅・酸化シリカ・酸化亜鉛) を飼育水に入れ、超音波にて分散後、血管内皮細胞に特異的な *fli1* プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescence protein: GFP) を発現する遺伝子改変 (*fli1:egfp*) ゼブラフィッシュの受精卵に投与し、酸化金属ナノ粒子の血管新生への関与を検討した。

(2) 血管内皮コロニー形成細胞を培養し、サイズの異なる酸化亜鉛粒子を投与し、生細胞定量法 (MTS assay) にて細胞生存率を検討した。また、粒子投与後の血管内皮コロニー形成細胞のチューブ形成の程度を解析し、細胞における血管新生関連因子の発現を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。

(3) 動脈硬化モデルであるアポリポプロテイン E (ApoE) 欠損マウスに、カーボンナノチューブ (CNT) の中で、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) と二層カーボンナノチューブ (DWCNT) を投与した。2 か月後にオイルレッド染色法にて、大動脈の粥腫形成の程度を観察した。また、末梢血と骨髄における血管内皮前駆細胞数を測定し、その機能を分析した。

4. 研究成果

(1)- 遺伝子改変 (*fli1:egfp*) ゼブラフィッシュの受精卵に受精後 5 日間、酸化金属ナノ粒子 (酸化チタン・酸化銅・酸化シリカ・酸化亜鉛) を 0.01, 1, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で投与したところ、高濃度の酸化銅ナノ粒子の投与で、ゼブラフィッシュ腹部の横断方向に走る脈管数が減少していた (図 1)。

(1)- 異なる酸化金属ナノ粒子を投与後、血管内皮細胞を単離し、RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法で解析したところ、酸化銅ナノ粒子の投与では、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体の遺伝子発現が減少していた。

的リアルタイム PCR 法で解析したところ、酸化銅ナノ粒子の投与では、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体の遺伝子発現が減少していた。

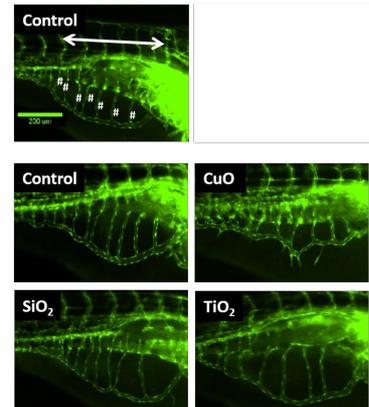


図1. 酸化金属ナノ粒子を投与したゼブラフィッシュの代表的な画像。#: 第2および第7の部分間枝を含む横断面 (白い矢印) の間に位置する横断方向に走る脈管数を観察。CuO、SiO₂、TiO₂ ナノ粒子 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

(1)- 培養した血管内皮細胞に酸化銅ナノ粒子を投与したところ、濃度依存的に細胞生存率を減少させ、アポトーシス指数を増加させた。これらの結果より、イオン化する酸化銅ナノ粒子が、血管増殖因子の発現の減少およびアポトーシスの誘導を介して、血管形成に影響を及ぼすことが示唆された。

(2)- ナノサイズとマイクロサイズの酸化亜鉛粒子を、培養した血管内皮コロニー形成細胞に投与したところ、濃度依存的に生存率が減少し、アポトーシスの誘導が認められた。酸化亜鉛ナノ粒子と同程度の亜鉛イオン濃度になるよう塩化亜鉛を投与したところ、同様の結果が得られた (図 2)。

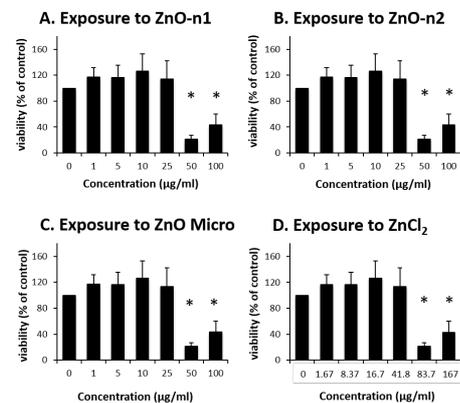


図2. 血管内皮コロニー形成細胞の細胞毒性 (A) ナノサイズの酸化亜鉛粒子1, (B) ナノサイズの酸化亜鉛粒子2, (C) マイクロサイズの酸化亜鉛粒子, (D) 塩化亜鉛投与後 24 時間の変化 データは平均±標準偏差

(2)- 血管内皮コロニー形成細胞のマトリックスゲル上のチューブ形成を解析したところ、酸化亜鉛粒子や塩化亜鉛の投与は、コ

ントロール群と比較し、同程度にチューブ形成を抑制することが確認された。これらの効果は、血管内皮増殖因子の受容体(VEGFR2)やケモカインの受容体(CXCR4)の発現の低下と関係していた。以上より、酸化亜鉛ナノ粒子は脈管形成に関連する受容体の発現低下を介して、脈管形成を抑制するが、これらの効果は放出された亜鉛イオンの濃度に規定されていることが明らかになった。

(3)- ApoE 欠損マウスに、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) と二層カーボンナノチューブ (DWCNT) を投与したところ、高濃度投与群で、2 か月後に大動脈の粥腫形成の亢進が認められた。また、大動脈から RNA を抽出し、接着因子(ICAM-1)の発現を解析したところ、CNT 投与で、ICAM-1 の発現の増加を確認した (図 3)。

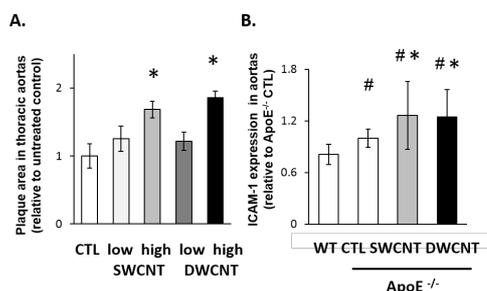


図3. ApoE欠損マウスの胸部大動脈におけるプラーク形成 (A)oil red法で染色し計測したプラーク領域。(B)胸部大動脈における接着因子(ICAM-1)の発現 データは平均±標準偏差 * $p < 0.05$

(3)- 血管内皮前駆細胞(EPC)は、骨髄から循環血中に動員され、その後、血管内皮損傷部位に移動すると言われている。CNT 投与後の骨髄中の EPC の機能への影響を検討したところ、CNT の投与は EPC のコロニー形成単位を減少させ、遊走機能を減弱させた。これらの結果より、SWCNT および DWCNT は、単球の内皮細胞への接着を促進し、EPC 機能不全を誘発することにより、粥腫形成を増強する可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計 16件)

Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, Kida S, Satoh M, Tomimoto H, Murata M, Oikawa S. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2017;39:231-238. (査読有) DOI: 10.1080/01616412.2017.1281195
 Huang F, Ichihara G, Yamada Y, Banu S, Ichihara S. Effect of 4-week inhalation exposure to 1-bromopropane on blood pressure in rats. *J Appl*

Toxicol 2017;37:331-338. (査読有)

DOI: 10.1002/jat.3364

Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Hayashi Y, Izuoka K, Kataoka M, Ichikawa S, Wu W, Zong C, Ichihara G, Ichihara S.

Single- and double-walled carbon nanotubes enhance atherosclerosis by promoting monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial progenitor cell dysfunction. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:54. (査読有)

DOI: 10.1186/s12989-016-0166-0

Zong C, Garner CE, Huang C, Zhang X, Zhang L, Chang J, Toyokuni S, Ito H, Kato M, Sakurai T, Ichihara S, Ichihara G. Preliminary

characterization of a murine model for 1-bromopropane neurotoxicity: Role of cytochrome P450. *Toxicol Lett* 2016;258:249-258. (査読有)

DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.07.006

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Fukatsu H, Shimanuki Y, Tanaka N, 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* 2016;17:576. (査読有) DOI: 10.3390/ijms17040576

Ichihara S, Li W, Omura S, Fujitani Y,

Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Ding X, Maynard A, Kobayashi T,

Ichihara G. Exposure assessment and heart rate variability monitoring in

workers handling titanium dioxide particles-a pilot study. *J Nanopart Res* 2016;18:52. (査読有)

DOI: 10.1007/s11051-016-3340-2

Nakatochi M, Ichihara S, Yamamoto K, Ohnaka K, Kato Y, Yokota S, Hirashiki A, Naruse K, Asano H, Izawa H, Matsubara T, Yokota M.

Epigenome-wide association study suggests that SNPs in the promoter region of RETN influence plasma resistin level via effects on DNA methylation at neighboring sites. *Diabetologia* 2015;58:2781-2790. (査読有) DOI: 10.1007/s00125-015-3763-9

Zhang L, Zong C, Ichihara S, Naito H, Toyokuni S, Kumagai S, Ichihara G. A

trial to find appropriate animal models of dichloropropane-induced cholangiocarcinoma based on the hepatic distribution of glutathione

S-transferases. *J Occup Health* 2015;57:548-554. (査読有)

DOI: 10.1539/joh.15-0085-OA

Tada-Oikawa S, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Yamada Y, Mishima T,

Ichihara S. Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles was involved in the attenuation of vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. *Toxicol Rep* 2015;2:692-701. (査読有)
Chang J, Ichihara G, Shimada S, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Radwa S, 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* 2015;15:2140-2147. (査読有)
Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Hu S, Huang H, Ichihara G. Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;282:151-160. (査読有)
DOI: 10.1016/j.taap.2014.10.016
Wu W, Ichihara G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza ES, Ichihara S. Snergistic 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* 2014;16:660-676. (査読有)
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* 2014;278:16-25. (査読有)
DOI: 10.1016/j.taap

〔学会発表〕(計 63件)

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田 百合果、市原 学：酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性による血管内皮細胞への影響 第 87 回日本衛生学会学術総会 「フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市)」2017.3.26-28
長田 百合果、渡邊 英里、プラニッチ サンドラ、市原 佐保子、櫻井 敏博、鈴木 利宙、ポーランド ソニア、トラン ラン、安部 良、市原 学：シリカナノ粒子の表面修飾と RAW264.7 細胞応答との関係 第 87 回日本衛生学会学術総会 「フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市)」2017.3.26-28

Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Gaku Ichihara. Effect of physicochemical characteristics of nano-sized TiO₂ on adhesion of monocytes to endothelial cells. 11th International Particle Toxicology Conference, Singapore, Republic of Singapore, Sep 26-30 2016.

Eri Watanabe, Sandra Vranic, Sahoko Ichihara, Wenting Wu, Yurika Osada, Toshihiro Sakurai, Sonja Boland, Lang Tran, Gaku Ichihara. Surface modification of silica nanoparticles affect their uptake by the cells and subsequent pulmonary toxicity. 11th International Particle Toxicology Conference, Singapore, Republic of Singapore, Sep 26-30 2016.

Sandra Vranic、渡邊 英里、市原 佐保子、呉 文亭、長田 百合果、張 靈逸、櫻井 敏博、Sonja Boland、Lang Tran、市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症誘導作用との関係 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 「昭和大学旗の台キャンパス(東京都・品川区)」2016.9.10-11

Sahoko Ichihara, Yuka Suzuki, Kiyora Izuoka, Gaku Ichihara. Ablation of aryl hydrocarbon receptor promotes angiotensin II-induced cardiac fibrosis by enhancing c-Jun transcriptional activity. 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology, Serville, Spain, Sep 4-7 2016.

Gaku Ichihara, Yuka Suzuki, Eri Watanabe, Arisa Hayashida, Yurika Osada, Tomoki Furutani, Kiyora Izuoka, Sahoko Ichihara. Effects of nano-sized TiO₂ on the adhesion of monocytes to endothelial cells by the differences in the crystal structure and characteristics of the surface of nanoparticles. 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology, Serville, Spain, Sep 4-7 2016.

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田 百合果、市原 学：酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性による血管内皮細胞への影響の検討 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 「東京理科大学森戸記念館(東京都・新宿区)」2016.8.4-5
渡邊 英里、プラニッチ サンドラ、市原 佐保子、呉 文亭、鈴木 利宙、長田 百合果、張 靈逸、櫻井 敏博、ポーランド ソニア、トラン ラン、安部 良、市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子の表面修

飾と炎症誘導作用との関係 第 44 回産
業中毒・生物学的モニタリング研究会
「東京理科大学森戸記念館(東京都・新
宿区)」2016.8.4-5

市原 佐保子、鈴木 悠加、古谷 知己、出
岡 淑、渡邊 英里、林田 有紗、長田 百
合果、市原 学：酸化チタンナノ粒子によ
る血管内皮細胞への単球の接着能に対す
る影響 第 43 回日本毒性学会学術年会
「ウインクあいち(愛知県・名古屋市)」
2016.6.29-7.1.

渡邊 英里、サンドラ プラニッチ、市原
佐保子、呉 文亭、鈴木 利宙、長田 百合
果、ソニア ポーランド、ラン トラン、
櫻井 敏博、安部 良、市原 学：マウスに
おけるシリカナノ粒子の表面修飾と炎症
誘導作用との関係 第 43 回日本毒性学
会学術年会 「ウインクあいち(愛知県・
名古屋市)」2016.6.29-7.1

市原 学、小林 隆弘、市原 佐保子：ナノ
マテリアル有害性評価と労働環境衛生学
第 43 回日本毒性学会学術年会 「ウイン
クあいち(愛知県・名古屋市)」
2016.6.29-7.1

Gaku Ichihara, Sandra Vranic, Sahoko
Ichihara, Wenting Wu, Eri Watanabe,
Arisa Hayashida, Yurika Osada,
Toshihiko Sakurai, Sonja Boland, Lang
Tran. Surface Modifications of Silica
Nanoparticles Affect Their Uptake By
The Cells And Subsequent Pulmonary
Toxicity. 8th International Nanotoxici-
cology Congress, Boston USA, June 1-4
2016.

渡邊 英里、プラニッチ サンドラ、市原
佐保子、呉 文亭、鈴木 利宙、林田 有紗、
長田 百合果、張 靈逸、ポーランド ソニ
ア、トラン ラン、櫻井 敏博、安部 良、
市原 学：マウスにおけるシリカナノ粒子
の表面修飾と炎症誘導作用との関係 第
86 回日本衛生学会学術総会 「旭川市民
文化会館(北海道、旭川市)」2016.5.11-13
市原 佐保子、鈴木 悠加、呉 文亭、出岡
淑、伊東 健、山本 雅之、市原 学：吸引
投与による多層カーボンナノチューブの
影響とその作用機序の検討 第 86 回日
本衛生学会学術総会 「旭川市民文化会
館(北海道、旭川市)」2016.5.11-13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 佐保子 (ICHIHARA Sahoko)
三重大学・地域イノベーション学研究所・
准教授
研究者番号：20378326

(2) 研究分担者

田中 利男 (TANAKA Toshio)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00135443

竹下 享典 (TAKESHITA Kyousuke)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70444403

市原 学 (ICHIHARA Gaku)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90252238

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()