

主論文の要旨

Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages

シリカナノ粒子の粒子径、および表面化学修飾はマクロファージのエンドソーム内でのROS産生を調節する事で肺障害の重症度に影響する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

井上 正英

【緒言】

今日、様々なナノマテリアルが日常生活に用いられている。非晶質性シリカナノ粒子は医薬品、化粧品など様々な分野で汎用されているが、近年その毒性についての報告が相次いでおり、その体内動態の解明、安全性の確立が急務となっている。特に肺は呼吸によって外界と接する臓器であり、微粒子吸引による健康被害が懸念されている。非晶質性シリカナノ粒子による肺毒性メカニズム解明の為、シリカ粒子の粒子径、表面化学修飾の差異による呼吸器系への影響を解析した。

【対象及び方法】

特性が異なる 3 つの非晶質性シリカ粒子 (50nm 径表面非修飾 (50nm-plain)、同径表面アミノ基修飾粒子 (50nm-NH₂)、3 μ m 径非修飾粒子 (3 μ m-plain)) をマウス (C57BL/6J、約 8-10 週齢) に単回気管内投与し、72 時間後の肺毒性を評価した。またマウス単球系細胞株 Raw264.7 を用い、上記シリカ粒子に対する反応の差を貪食能、免疫応答、エンドソームにおける ROS (Reactive Oxygen Species) 産生の点で評価した。

【結果】

図 1 ナノシリカをマウスに投与すると、サイズ、表面修飾の違いによってフェノタイプに差が生じた。

ナノシリカをマウスの気管内に投与すると、vehicle、3 μ m-plain 投与群では体重はほぼ変わらないが、50nm-plain 群では 3 日目まで体重が減少し、50nm-NH₂ 群では減少した体重が 3 日目には回復に転じた (図 1A)。ナノシリカ投与後 72 時間の肺の病理組織像では 50nm-plain 群で主に好中球による炎症所見を認めたが、3 μ m-plain 群、50nm-NH₂ 群では炎症像は軽度であった (図 1B-D)。

図 2 50nm-plain を気管内に投与した群は、肺内の好中球と好中球を誘導するケモカインの増加を認めたが、3 μ m-plain 群、50nm-NH₂ 群では増加は見られない。

ナノシリカを投与したマウスの肺胞洗浄液中の細胞分画を解析すると、50nm-plain 群では好中球が有意に増加した (図 2C)。さらに肺組織において、50nm-plain では MIP2、TNF α 、MIP1 α といったケモカインの増加を認めたが、3 μ m-plain 群、50nm-NH₂ 群では増加は見られなかった (図 2F-H)。

図 3 マウス単球系細胞株 RAW264.7 細胞にナノシリカを投与すると、サイズ、表面修飾の違いによって貪食、ケモカインの発現に差が生じる。

マウス単球系細胞株である Raw264.7 細胞を用いて蛍光免疫、フローサイトメトリーを行ったところ、3 μ m-plain 群の貪食率は 50nm のシリカ粒子に比べて低下していた (図 3A-C)。MIP2、TNF α 、MIP1 α といったケモカインの発現は 50nm-plain 群と比べて 50nm-NH₂ 群で低下していた (図 3D,E,F)。

図4 ナノシリカはRAW264.7細胞に貪食されるとエンドソーム内に集簇する。

蛍光標識デキストランを用いて、RAW264.7細胞に貪食された後のナノシリカの局在を評価したところ、50nm-plain、50nm-NH₂共にエンドソーム内にあることが分かった。

図5 ナノシリカによるケモカインの産生は、NOX2によるendosomal ROSを介している。

ナノシリカ投与時RAW264.7細胞内で産生されたROSを測定するため、DCFDAを用いて評価した。その結果50nm-plain群で増加したが50nm-NH₂群では低下した(図5A,B)。次にROSとケモカイン発現との関連を調べる為に、ROSスカベンジャーであるN-アセチルシステインを加えてナノシリカを投与すると、ケモカインの発現は低下した(図5C-E)。マクロファージなどの貪食細胞ではエンドソームのNOX2(NADPHオキシダーゼ)がROSを産生することが知られている。エンドソーム内のROSを特異的に可視化するためにOxyBURST Green reagentを用いて評価したところ、50nm-plain群では細胞内に複数個のpunctaを認めるのに対して、50nm-NH₂群では有意に少なかった(図5F,G)。endosomal ROSとケモカイン発現の関係を調べるために、NOX2を特異的に阻害するgp91ds-tatを投与したところ、ケモカインの発現は有意に低下した(図5H-J)。

【考察】

今回の研究でシリカ粒子が肺で引き起こす炎症の程度、シリカ粒子を貪食したマクロファージが産生するケモカインの量が、シリカ粒子のサイズ、表面修飾の違いによって差があることが明らかとなった。RAW264.7細胞を用いて各シリカ粒子の貪食に関して評価したところ、3 μ mのサイズではRAW264.7細胞の貪食が少なかったのに対して、50nmのサイズでは表面修飾の有無に関係なくRAW264.7細胞への貪食は同程度であった。以上から、50nm-plainと50nm-NH₂によるケモカイン発現の差はRAW264.7細胞に貪食された後の反応の違いによって起こると考えられた。RAW264.7細胞内でのシリカ粒子の局在を調べたところ、エンドソーム内にあることが分かった。そして、エンドソーム内のROSに注目したところ、50nm-NH₂では50nm-plainに比べて発現が低下した。エンドソームにおけるROSの産生に関与するNOX2を特異的に阻害するgp91ds-tatを投与すると、ケモカインの発現が著明に低下した。以上から、シリカ粒子によってRAW264.7細胞がケモカインを発現するにはNOX2を介したROSの産生が重要であることが分かった。

今回の研究ではシリカ粒子の表面修飾の差異とNOX2活性化との関連性に関して依然として明らかでない。それに対して我々は以下の2つの仮説を立てた。1つ目は、シリカナノ粒子がエンドソーム内に蓄積し、シリカナノ粒子表面のシラノール基がエンドソーム膜に作用し、small ruptureを起こすという仮説である。エンドソーム内のプロトンやカルシウムイオンがsmall ruptureを介して細胞質内に漏れ出すことでNOX2活性化のトリガーとなっているかもしれない。2つ目は、シリカナノ粒子を認

識するスカベンジャー受容体がエンドソーム膜に存在し、粒子を認識することで NOX2 を活性化させているという仮説である。50nm-NH₂ はスカベンジャー受容体に対する親和性が低く、NOX2 が活性化せず、ROS の産生が低下する可能性を考えた(図 6)。

今回の研究結果から、シリカナノ粒子が引き起こす肺毒性のメカニズムとしてエンドソーム内の ROS の産生が重要である事が明らかとなった。更に、エンドソーム内の ROS 産生には NOX2 が重要であり、これを制御する事で肺炎症を司るケモカインの産生を制御できる事が示唆された。今回得られた知見を基に、今後は他の名のマテリアルや PM2.5 などの環境中の微粒子がもたらす肺毒性が同様のメカニズムで起こっているのかを検討し、微粒子が引き起こす肺毒性の治療に NOX2 の制御が有効かどうか、更なる研究を行っていく必要がある。

【結語】

非晶質性シリカ粒子による肺傷害において、粒子径は貪食細胞への貪食効率に、表面化学修飾は貪食細胞の NOX2 を介したエンドソーム内 ROS 産生に、それぞれ影響して肺傷害の程度を制御している事が示唆された。