

Title	安全性に優れたナノマテリアル創製に向けた非晶質シリカ・酸化チタンの粒子特性-自然免疫応答連関とそのメカニズム解析
Author(s)	森重, 智弘
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/57949">http://hdl.handle.net/11094/57949</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【16】

氏名	もり しげ とも ひろ 森 重 智 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 23759 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	安全性に優れたナノマテリアル創製に向けた非晶質シリカ・酸化チタンの 粒子特性－自然免疫応答連関とそのメカニズム解析
論文審査委員	(主査) 教 授 中川 晋作 (副査) 教 授 松田 敏夫 教 授 平田 収正 教 授 堤 康央

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年の産業技術の進展に伴い、物質をナノメートルサイズに制御したナノマテリアル（1次粒子径が100 nm以下）の開発が、世界的に推し進められている。これらナノマテリアルは、ナノサイズであるが故の組織浸透性・表面積・熱反応性の増大など、種々の有用機能を発揮し得るため、夢の万能素材として、医学・工学・薬学などあらゆる領域において既に汎用されている。現在では、機能性を向上させるための表面修飾や、医薬品の徐放性を高めるための形状制御が施されたものなど、新たなナノマテリアルが続々と開発されており、その適用範囲は益々拡大しつつある。

しかし、ナノマテリアルの生体影響は未だ十分に解明されていないのが現状である。ナノマテリアルは、ナノメートルサイズであることに起因する予期せぬ体内挙動を取る可能性や、熱反応性の増強などによる未知の有害性を示す可能性が明らかとされ始めている。事実、ナノマテリアルを異物として認識したマクロファージが、過

劇反応や機能不全を起こすことが報告されるなど、ナノマテリアルが未知の免疫攪乱作用を呈する危険性が指摘されている。これらマクロファージの機能異常は、炎症性疾患の発症や感染症罹患率の増大など、多岐に渡る病態の発症要因となり得るものと考えられる。また、ナノマテリアルによる生体影響は、粒子径や表面電荷、形状をはじめとした粒子特性によって大きく変化することが明らかとなりつつある。従って、ナノマテリアルの恩恵を最大限に享受するためには、粒子特性と生体影響との連関を体系的に評価し、得られた情報に基づく、安全性・有効性を兼ね備えた新たなナノマテリアルの粒子設計が必要不可欠であると考えられる。

数あるナノマテリアルの中でも、非晶質シリカ (SP) は、分散性に優れること、表面修飾が容易であることなど数多くの利点を有しており、化粧品や医薬品をはじめとした様々な分野で既に汎用されている。しかし近年、ナノメートルサイズのSPを過剰吸入した場合、肺組織における炎症、さらには炎症誘発性の発がん作用をも惹起し得ることが明らかとされた。そこで本研究では、安全性に優れた新規ナノマテリアルの設計に向けた基礎情報の集積を目指し、粒子径・表面修飾基の異なる様々なSPが、マクロファージ・生体にもたらす起炎性、並びに自然免疫応答に及ぼす影響を体系的に評価すると共に、そのメカニズム解析を試みた。

ナノマテリアル特有の生体影響・作用機序を明らかとするためには、従来のマイクロメートルサイズのマテリアルが有する起炎性、及びそのメカニズムなどを十分に把握した上で、両者の共通点・相違点を比較検討することが極めて重要であると考えられる。そこでまず、マイクロメートルサイズである1000 nmのSP (mSP1000) の起炎性を評価した。mSP1000をヒトマクロファージ細胞株であるTHP-1細胞へと添加したところ、代表的な炎症性サイトカインであるinterleukine-1beta (IL-1 $\beta$ ) の産生量が有意に亢進した。また、mSP1000によるIL-1 $\beta$ 産生は、reactive oxygen species (ROS) の産生に基づくエンドソームの破壊と、それに続くinflammasomeと呼ばれる分子複合体の活性化という一連の経路により誘導されることを明らかとした。すなわち、安全性に優れたナノマテリアルの創製に向けては、上流因子であるROS産生を回避し得る新たな粒子設計法の開発が重要であると考えられた。そこで、mSP1000に対して官能基修飾を施すことで、表面特性と起炎性との連関評価を行った。その結果、官能基修飾されたmSP1000は、未修飾のmSP1000と比較して、細胞内取り込み量は同等であるにも関わらず、mSP1000によるROS産生誘導能が著しく減弱し、IL-1 $\beta$ 産生が顕著に抑制されることを見出した。本結果は、SPによるIL-1 $\beta$ 産生のメカニズムの一端を解明した初めての知見であると共に、官能基による表面修飾が安全性に優れたSPの開発に有用である可能性を示唆するものである。

次に、粒子径30 nm ~ 1000 nmのSPを用い、*in vitro*におけるSPの粒子径と起炎性との連関を評価した。その結果、mSP1000は300 nm以下のSPと比較して高いIL-1 $\beta$ 産生誘導能を示したのに対し、70 nm以下のSP作用群においては、IL-1 $\beta$ 産生は全く認められなかった。一方で、70 nm以下のSPは、ケモカインであるInterferon-gamma inducible 10 kDa protein (IP-10) の産生を顕著に誘導した。すなわちナノメートルサイズに制御されたSPは、サブミクロン・マイクロメートルサイズのSPとは異なる機序で炎症応答を誘導することが判明した。そこで、*in vivo* における粒子径と起炎性との連関を評価した。その結果、ナノメートルサイズのSPは、300 nm、1000 nmのSPと比較して強い起炎性を有していることが明らかとなった。続いて、強い起炎性を示した70 nmのSP (nSP70) に対する官能基修飾の影響を評価した。その結果、nSP70をカルボキシル基で表面修飾したSP (nSP70-COOH) 作用群においては、*in vitro*、*in vivo*における起炎性はいずれもほとんど認められなかった。すなわち、ナノメートルサイズのSPは強い起炎性を有するものの、官能基修飾を施すことでその起炎性を著しく減弱可能であることが示された。そこで、粒子単独での起炎性が低いnSP70-COOHが、Toll like receptor (TLR) 刺激により惹起される自然免疫応答に及ぼす影響を解析した。その結果、nSP70-COOHはlipopolysaccharide (LPS) 刺激により誘導されるTLR4依存的なTNF $\alpha$ の産生を増大させる一方で、IL-6の産生

に対しては抑制的に作用するなど、TLR刺激による自然免疫応答を正・負に攪乱することが明らかとなった。そこで、SPとLPS共作用時における、代表的な転写因子であるnuclear factor kappaB (NF $\kappa$ B) の活性レベルを評価することで、メカニズム解明を試みた。その結果、nSP70-COOHはLPS刺激により惹起されるNF $\kappa$ Bの活性化を抑制することを見出し、IL-6の産生量の低下に寄与している可能性が考えられた。現在、他の転写因子についても同様に検討し、nSP70-COOHがLPS刺激によるTNF $\alpha$ の産生量を増大した要因を検証している。

さらに本研究においては、様々な粒子特性の酸化チタンを用いた粒子特性と起炎性との連関評価を試みた。酸化チタンのIL-1 $\beta$ 産生誘導能は粒子特性に応じて大きく変動し、その産生メカニズムはSPと同様、ROS産生によるエンドソームの破壊に基づくことを明らかとしている。

以上、本研究では安全性に優れたナノマテリアルの創製に向けた基礎情報の集積を図り、粒子特性と起炎性、自然免疫応答との連関を評価すると共に、そのメカニズムの一端を明らかとした。本研究成果は、粒子特性と生体影響との体系的な連関評価による基礎情報の集積と、それに基づくナノマテリアルの最適化研究の重要性・有効性を示すと共に、ナノマテリアルの安全性評価に免疫攪乱作用という新たな概念の導入を提唱するものであり、今後の安全性・機能性に優れたナノマテリアル開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待する。

## 論文審査の結果の要旨

近年の産業技術の進展に伴い、物質をナノメートルサイズに制御したナノマテリアル (1次粒子径が100 nm以下) の開発が、世界的に推し進められている。これらナノマテリアルは、ナノサイズであるが故の組織浸透性・表面積・熱反応性の増大など、種々の有用機能を発揮し得るため、夢の万能素材として、医学・工学・薬学などあらゆる領域において既に汎用されている。しかし、ナノマテリアルの生体影響は未だ十分に解明されていないのが現状である。ナノマテリアルは、ナノメートルサイズであることに起因する予期せぬ体内挙動を取る可能性や、熱反応性の増強などによる未知の有害性を示す可能性が明らかとされ始めている。数あるナノマテリアルの中でも、非晶質シリカ (SP) は、分散性に優れること、表面修飾が容易であることなど数多くの利点を有しており、化粧品や医薬品をはじめとした様々な分野で既に汎用されている。しかし近年、ナノメートルサイズのSPを過剰吸入した場合、肺組織における炎症、さらには炎症誘発性の発がん作用をも惹起し得ることが明らかとされた。そこで本研究では、安全性に優れた新規ナノマテリアルの設計に向けた基礎情報の集積を目指し、粒子径・表面修飾基の異なる様々なSPが、生体にもたらす起炎性、並びに自然免疫応答に及ぼす影響を体系的に評価すると共に、そのメカニズム解析を試み、以下の結論を得た。

1. 粒子径1000 nmのSP (mSP1000) がTHP-1細胞に対してIL-1 $\beta$ 産生を惹起することを明らかとし、そのメカニズムがmSP1000によるROS産生の誘導に依存することを見出した。一方、官能基修飾を施すことでmSP1000によるROS産生を抑制し、IL-1 $\beta$ 産生を顕著に抑制可能であることを明らかとした。
2. SPは粒子径に応じて異なる機序で炎症を惹起する可能性を示すと共に、ナノメートルサイズのSPが、マイクロメートルサイズのSPと比較して強い起炎性を示すことを明らかとした。さらに、官能基による表面修飾が粒子径70 nmのSP (nSP70) の起炎性を著しく減弱することを実証した。
3. nSP70の表面をカルボキシル基修飾したnSP70-COOHが、TLR4刺激によるサイトカイン産生パターンを大きく変動することを明らかとした。さらにそのメカニズムが、TLR刺激により惹起されたNF $\kappa$ -Bの活性をnSP70-COOHが抑制することに起因する可能性を示した。
4. 酸化チタンのIL-1 $\beta$ 産生誘導能は粒子特性によって大きく変動するものの、その産生メカニズムはSPと同様、ROS産生によるエンドソームの破壊に基づくことが示唆された。

本研究成果は、粒子特性に応じたナノマテリアルの基礎情報集積が、安全性の向上につながる可能性を示すものであり、今後の安全性・機能性に優れたナノマテリアル開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待され、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。