

平成 29 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究
生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

| | | |
|-------|-------|---------------------|
| 分担研究者 | 石丸 直澄 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授 |
| 研究協力者 | 新垣理恵子 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部・准教授 |
| | 牛尾 綾 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部・助教 |
| | 大塚 邦紘 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部・大学院生 |

研究要旨

ナノマテリアルの曝露によるマクロファージを中心とした免疫システムの制御機構は不明な点が多い。本研究では、Taquan 法にて分散処理を施した多層カーボンナノチューブ（T-CNT7）を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。T-CNT7 の吸入曝露により、8 週まで肺胞マクロファージの割合は有意に減少するのに対し、好酸球、単球は増加することがわかった。また、T-CNT7 の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT7 曝露により肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体に関係していることが示唆された。肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT7 の曝露で有意に増加することが示された。さらに、T-CNT7 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の BALF 中での上昇が確認された。以上のことから、いくつかの肺胞マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性が示された。

A．研究目的

本研究事業は、工業的ナノマテリアル（NM）の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージ（M₁）の *in vivo* 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

平成 29 年度 of 分担研究では分散処理を施した多層カーボンナノチューブを用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を

解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。

B．研究方法

・マウス

12 週齢の C57BL/6NCrSlc（雄）を用い、各群 5 匹ずつ（5 × 3 × 4 = 60 匹）で多層カーボンナノチューブを吸入曝露装置（国立医薬品食品衛生研究所）により曝露を実施し、曝露後（0 週）、1 週、4 週及び 8 週で適切に屠殺後解析を行った。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死

の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの曝露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

・T-CNT7

多層カーボンナノチューブは MWCNT-7(三井)を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により供与された Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT7)を用いた。対照群はフィルターを通したキャリアエア曝露とした。低用量群は $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間吸入した。高用量群は $3 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間の吸入とする。

・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C, TERUMO)を留置し、1mlのシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に1mlのPBSを流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識(fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7)された各種リンパ球表面マーカーCD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体(eBioscience, San Diego, CA)にて染色、0.9%-PFA-PBSで固定後、解析装置(FACSCant BD Biosciences)にてそれらの発現を解析した。

・定量化 RT-PCR 法

肺組織の一部を RNAlater に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全RNAを抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化

した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。CD204, forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3', and reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3'; MARCO: forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; CD36: forward, 5'-TGGCCTTACTTGGGATTGG-3', and reverse, 5'-CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3'; SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; CD68: forward, 5'-TCTTGGGAACACTACACGTGGGC-3', and reverse, 5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'; iNOS: forward, 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' and reverse, 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'; MMP-12: forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3' and reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3'; β -actin, forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80°C にて保存する。各サンプルから $5 \mu\text{L}$ を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット(Biorad)マニュアルに従って実施する。解析項目は、IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , VEGF, FGF basic である。

C. 研究結果

正常 C57BL/6NCrSlc 雄 (12 週齢) マウスに T-CNT7 (対照群、低濃度群、高濃度群) を全身吸入装置にて、曝露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (図 1)。各群は 5 匹ずつとする。

図 2 に示すように、T-CNT7 曝露後 0 週、CD11c および CD11b を用い、肺胞洗浄液中 (BALF) の免疫細胞 (肺胞マクロファージ: CD11c⁺CD11b⁻、単球: CD11c⁺CD11b⁺、好酸球: CD11c⁻CD11b⁺) をフローサイトメーターにて解析すると、肺胞マクロファージが減少することが明らかになった。一方で、単球、好酸球に関しては T-CNT7 曝露によって割合が増加していた。さらに、肺胞マクロファージを CD11b および F4/80 にて展開すると、T-CNT7 曝露によって割合が減少することがわかった (図 2、図 3A)。曝露後 0 週では、BALF 中の生細胞の割合は減少することがわかった (図 3A)。この時点では、肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトに大きな偏りは観察されない (図 3A)。

曝露後 1 週では、BALF 中の生細胞の割合に変化は見られなくなり (図 3B)、高用量曝露群で肺胞マクロファージが有意に減少している (図 2、図 3B)。単球、好酸球に関しては、高用量群で有意に増加した (図 3B)。また、肺胞マクロファージは高用量曝露群で M1 へのシフトが見られた (図 3B)。

曝露後 4 週では、1 週後と同様に、肺胞マクロファージ数は高用量群で有意に減少していた (図 2、図 4A)。また、単球、好酸球に関しても、高用量曝露群で有意に増加した状態が続いていた (図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトは明らかではなかった (図 4A)。

曝露後 8 週でも、T-CNT7 の高用量曝露群で、肺胞マクロファージの減少、好酸球、単球の増加が確認された (図 2、図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 分化は高用量曝露群で M1 へのシフトが抑制されていた (図 4B)。

T-CNT7 の吸入曝露による常在型肺胞マクロファージの変化を経時的に観察すると、高用量群では 0 ~ 8 週まで有意に低下していた (図 5A)。好酸球に関

しては 0 ~ 8 週後でいずれにおいても対照に比較して、高用量群で有意に増加していた (図 5B)。経時的には 1 週で増加し、その後 8 週まで徐々に減少することがわかる (図 5B)。単球に関しては、対照群に比較して、低用量、高用量ともにどの時期においても有意に割合が増加していた (図 6A)。経時的には曝露後 1 週から徐々に低下する傾向にあった (図 6A)。一方、M2 型マクロファージはどの群とも経時的に増加していたが、群間での差は認められなかった (図 6B)。

T-CNT7 曝露による肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 (CD36、CD163) の発現の変化をフローサイトメーターにて解析したところ、大きな変化は観察できなかった (図 7)。また、肺組織における各種スカベンジャー受容体、MMP12 などの mRNA 発現を定量 RT-PCR にて解析すると、T-CNT7 曝露後 0 週での CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現の有意な上昇 (図 8A)、1 週では MARCO の mRNA の有意な上昇 (図 8B)、4 週では CD204、iNOS の mRNA の有意な上昇 (図 8C) が観察された。MMP12 mRNA に関しては、どの時期においても低用量、高用量のいずれの群も T-CNT7 曝露によって有意に上昇することがわかった。

BALF 中のサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子に関して、マルチプレックス解析を実施すると、4 種類の因子が検出され、VEGF あるいは IL-12 が T-CNT7 吸入曝露によって増加することが判明した (図 9)。

脾臓、頸部リンパ節における B 細胞、CD4T 細胞 CD8T 細胞の割合に関しては、T-CNT7 曝露によってどの時期においても影響は見られなかった (図 10A、図 10B)。さらに、CD4 及び CD8T 細胞における活性化マーカー (CD44/CD62L) を検討したところ、脾臓、頸部リンパ節において、どの時期でも T-CNT7 の曝露で変化は確認されなかった (図 11A、図 11B)。

脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、T-CNT7 曝露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認めら

れなかった(図12A、図12B)。さらに、脾臓、頸部リンパ節におけるマクロファージにおける M1/M2 マーカー (CD192/CD206) を検討したところ、脾臓では T-CNT 曝露で変化は見られなかったが(図13A)、リンパ節において、曝露後4週で、M1 の低下、M2 の上昇が確認された(図13B)。

BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメーターによる解析結果から、細胞の大きにて評価すると、T-CNT7 曝露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった(図14A, B, C)。

D. 考察

T-CNT7 の吸入曝露により、8 週まで肺胞マクロファージ (CD11b^{low}) の割合は有意に減少するのに対し(高濃度群)、好酸球、単球あるいは CD11b^{high} マクロファージは増加することがわかった。また、T-CNT の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT 曝露により肺組織におけるスカベンジャーレセプターの mRNA 発現の変動が生じる可能性が示されたことから、ナノマテリアルの肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体が関係していることが示唆された。

肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT7 の曝露で有意に増加することが示されたが、昨年度までの研究(平成28年度今井田班報告済)でも、T-CNT7 の曝露後1年経過した時点で MMP12 の発現亢進が持続していたことから、T-CNT 曝露後、初期から長期に渡って MMP12 の発現が上昇するものと考えられる。さらに、T-CNT7 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子が BALF 中で上昇が確認された。

E. 結論

T-CNT7 の吸入曝露によって、肺胞マクロファージは T-CNT7 の処理によって細胞死を介して、細胞数が減少し、その後 M1/M2 分化の不均衡が生じる。また、いくつかの肺胞マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S, Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 in press
- (2) Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M. Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 in press
- (3) Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203
- (4) Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10
- (5) Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF-κB2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. (2017) 69(11):2193-2202.
- (6) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune

tolerance. J Clin Cell Immunol. (2017) 8(4):1000512

(7) Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. J Exp Med. (2017) 214:1925-1935.

(8) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. J Cytokine Biol. (2017) 2:1-5

(9) Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Autoimmunity: Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. Handbook of Immunosenescence 1-11, 2017

(10) 石丸直澄 口腔免疫とその異常 CLINICAL CALCIUM 27(10):21-26, 2017

2. 学会発表

(1) 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層カーボンナノチューブ長期曝露による免疫システムへの慢性毒性 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(2) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(3) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(4) 石丸直澄 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～ 第59回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジウム 2018年9月18日 松本

(5) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's Syndrome. 第46回日本免疫学会総会 2017年12月13日 仙台

(6) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N : A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第46回日本免疫学会総会 2017年12月13日 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

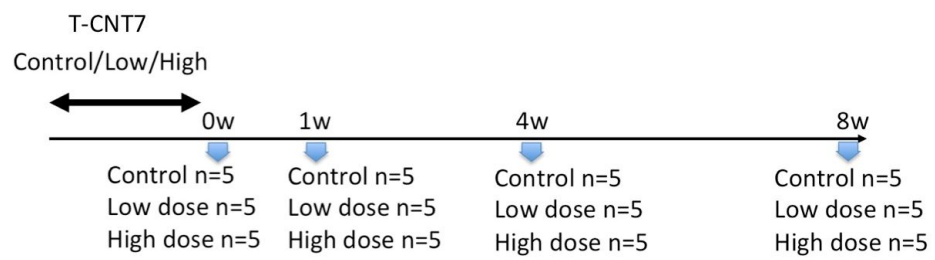
無し

3. その他

無し

☒ 1

Experimental Schedule



| | 0w | 1w | 4w | 8w |
|----------------|----|----|----|----|
| BALF/FCM | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| BALF/Multiplex | | | | ◎ |
| CLN/FCM | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Spleen/FCM | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Lung/q-RT-PCR | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |

図2

T-CNT 吸入曝露による肺胞洗浄液中の免疫細胞の変化

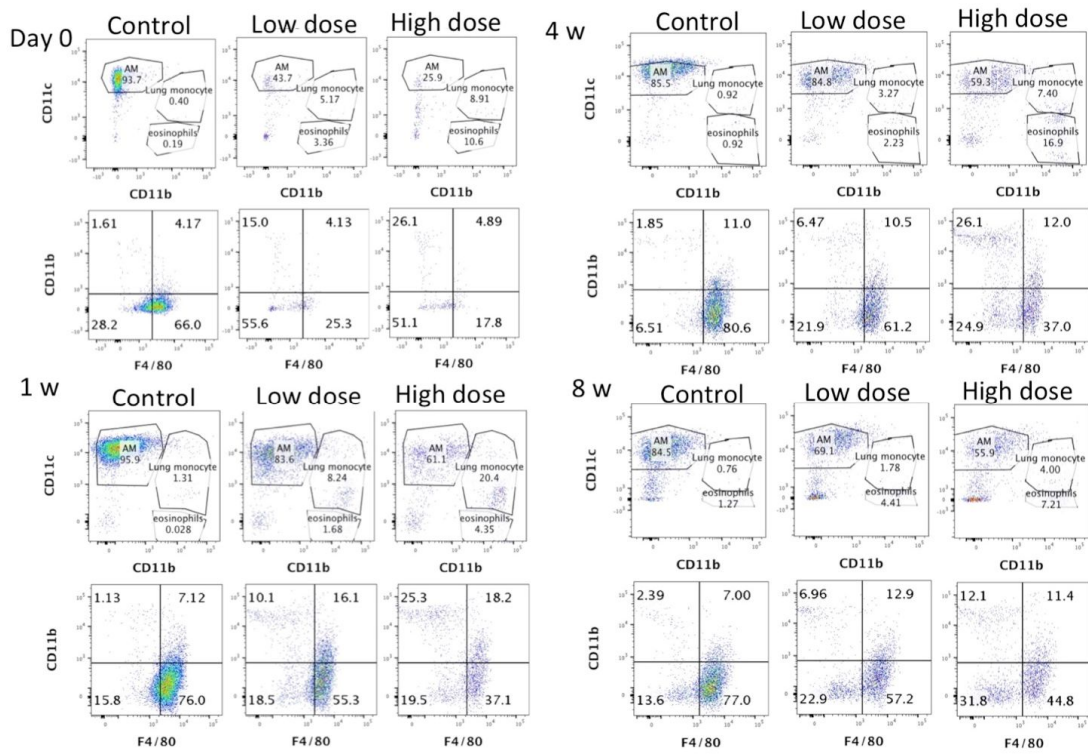
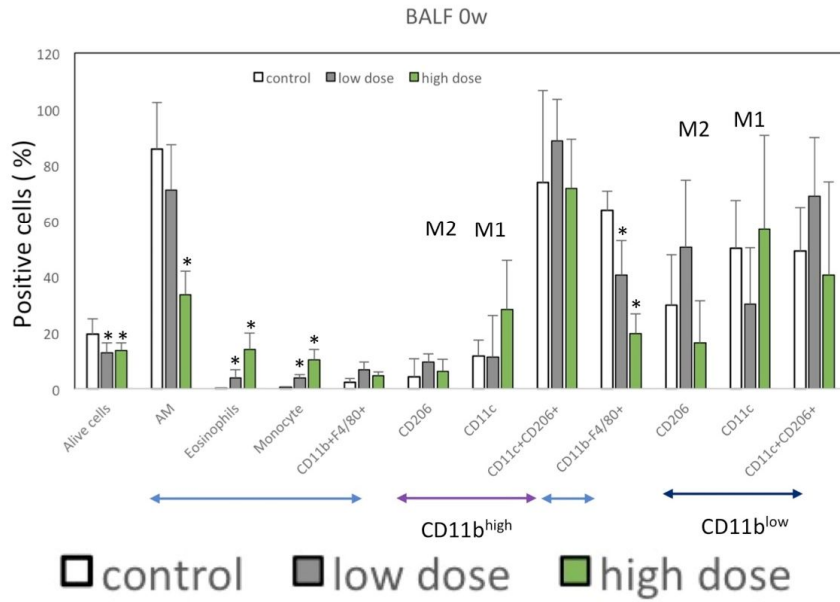


図3

A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



B 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する

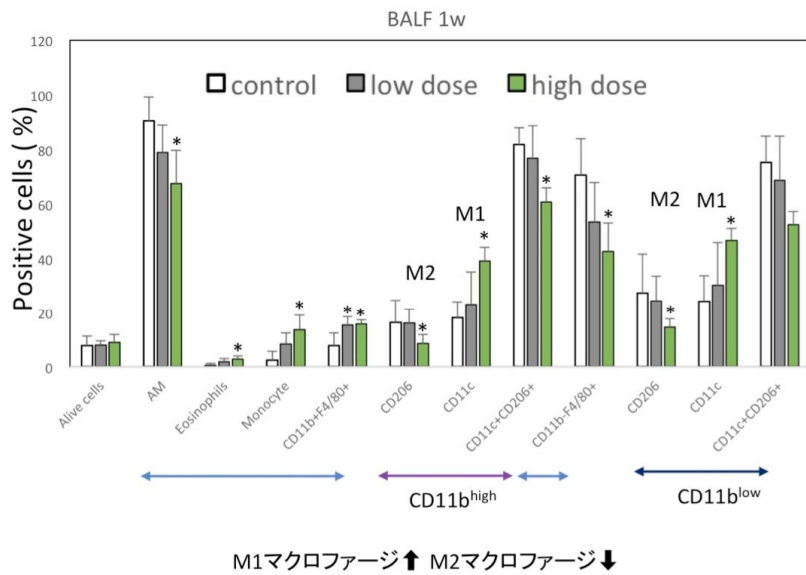
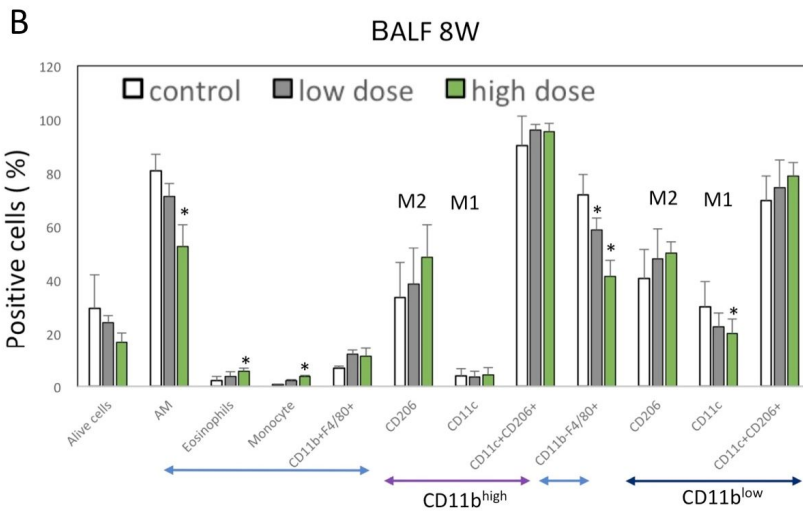
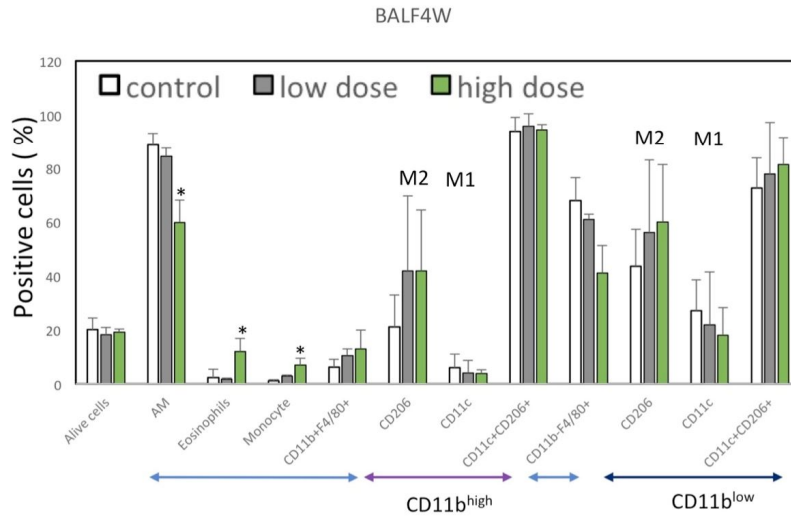


図4

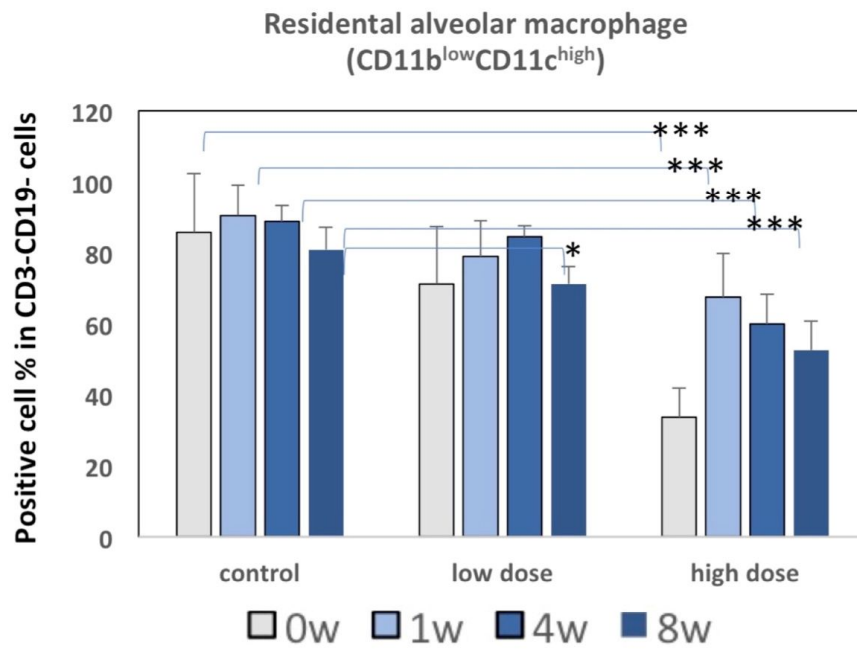
A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



M1マクロファージ↓

図5

A



B

暴露後8週まで肺胞マクロファージは減少してま (high dose)

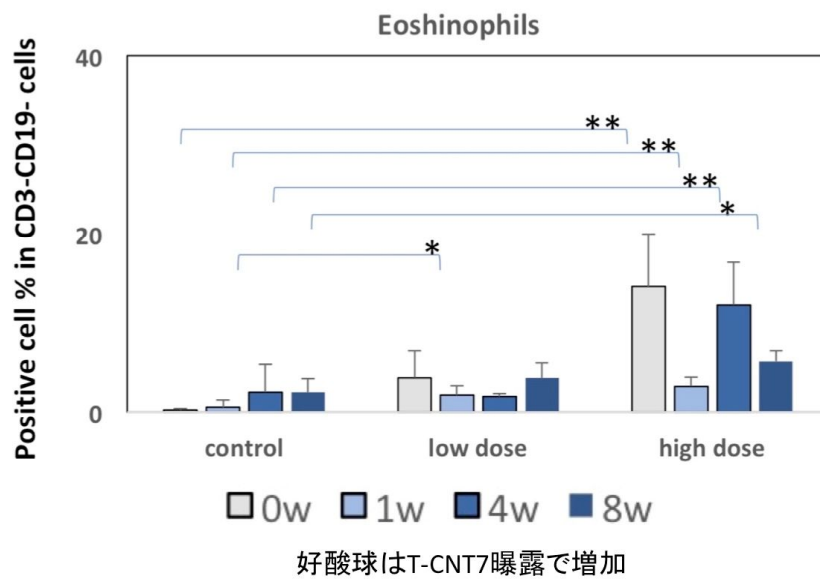
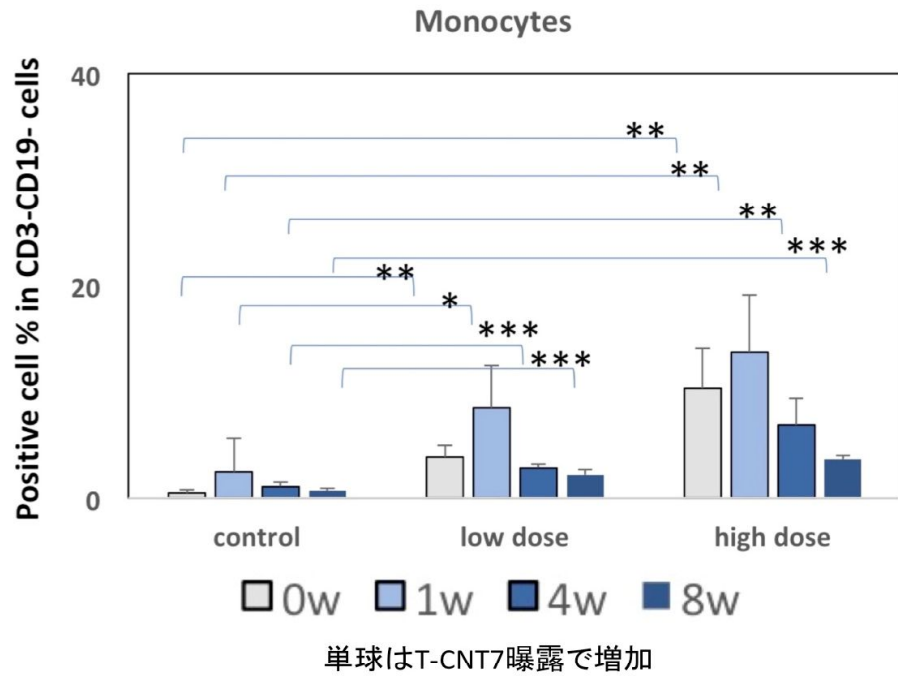


図6

A



B

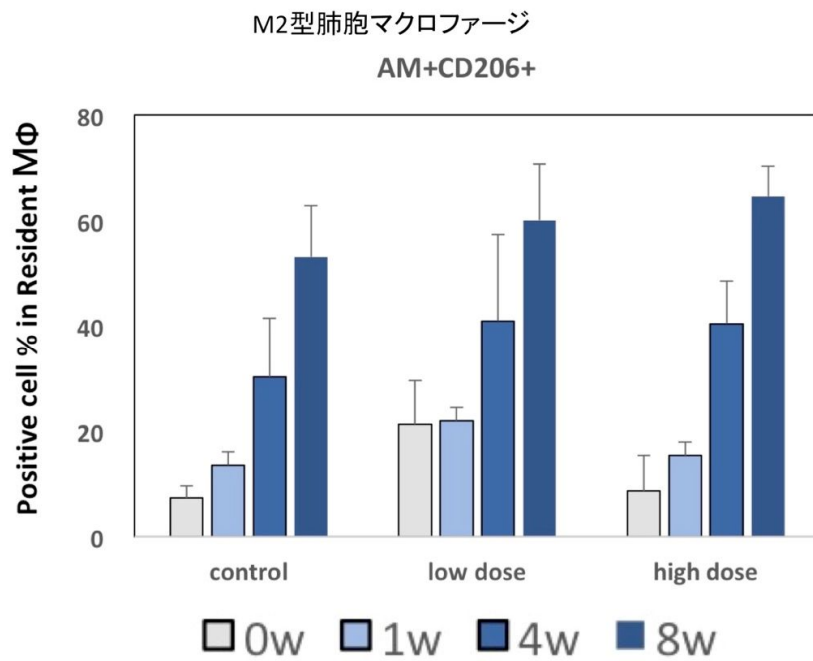
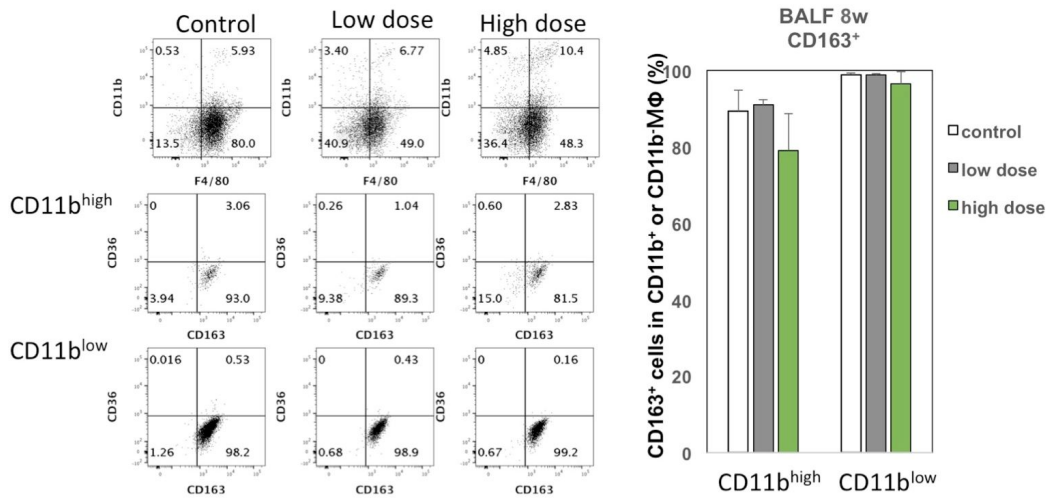
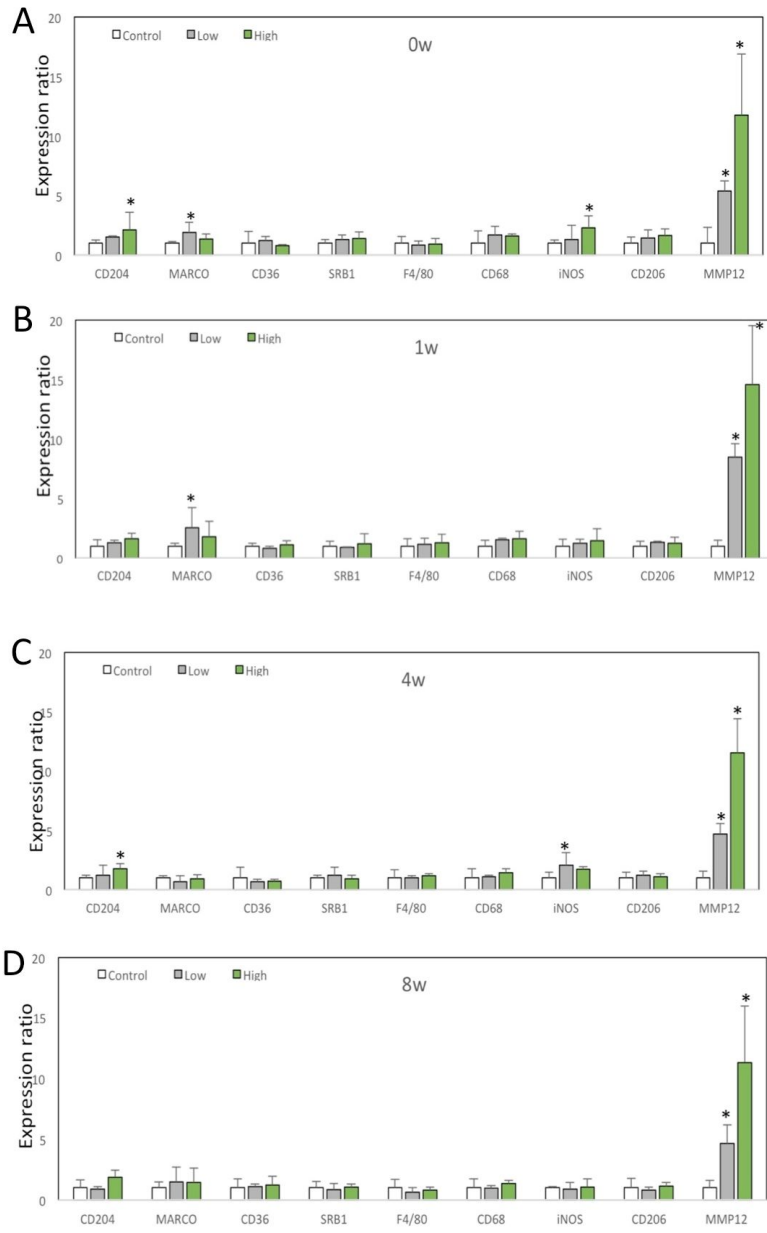


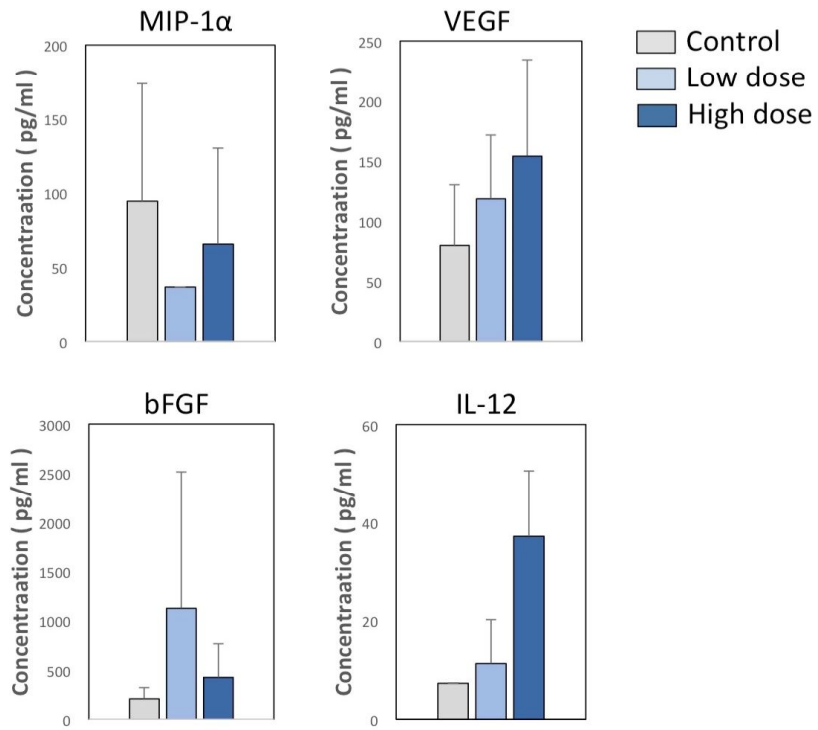
図7

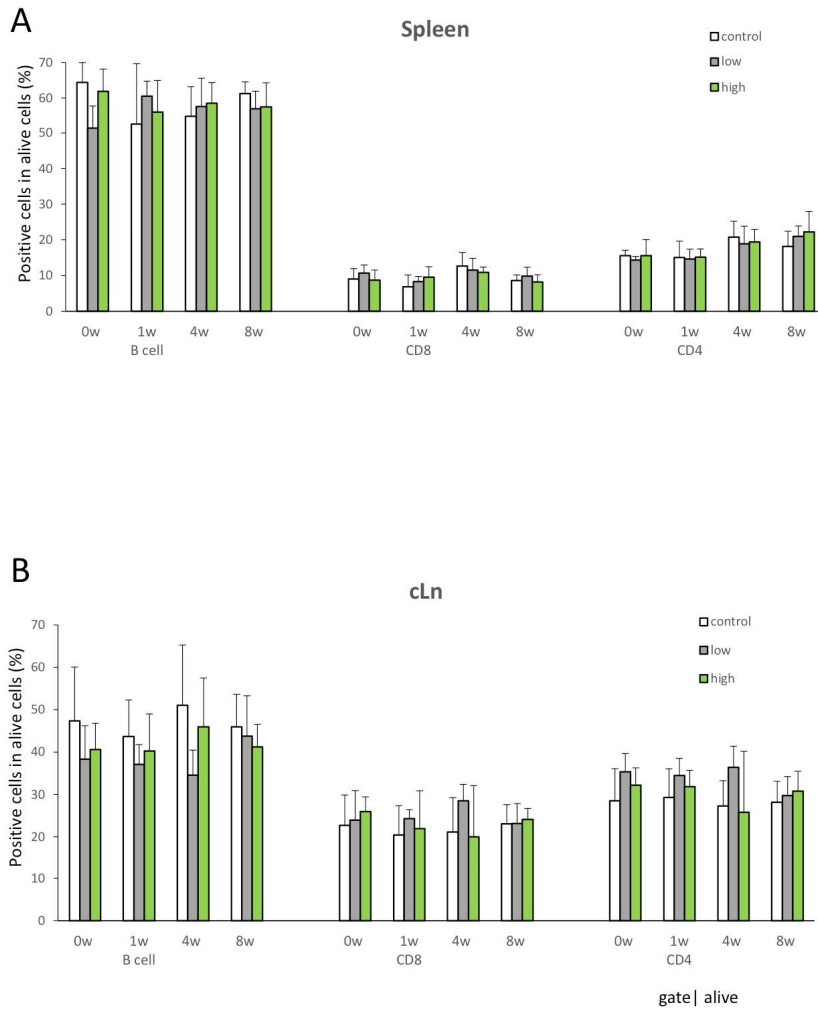
Scavenger receptor on alveolar macrophages





Levels of Cytokine, Chemokine and Growth Factor in BALF (8w)





11

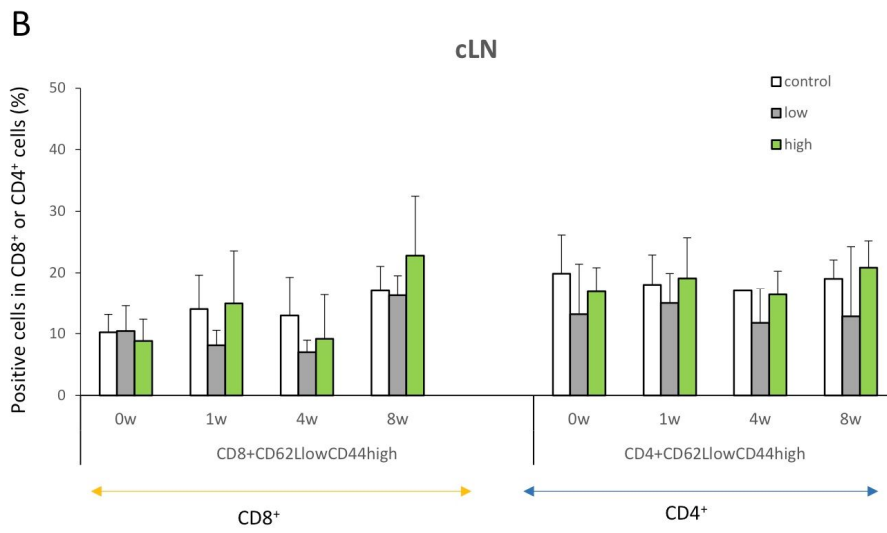
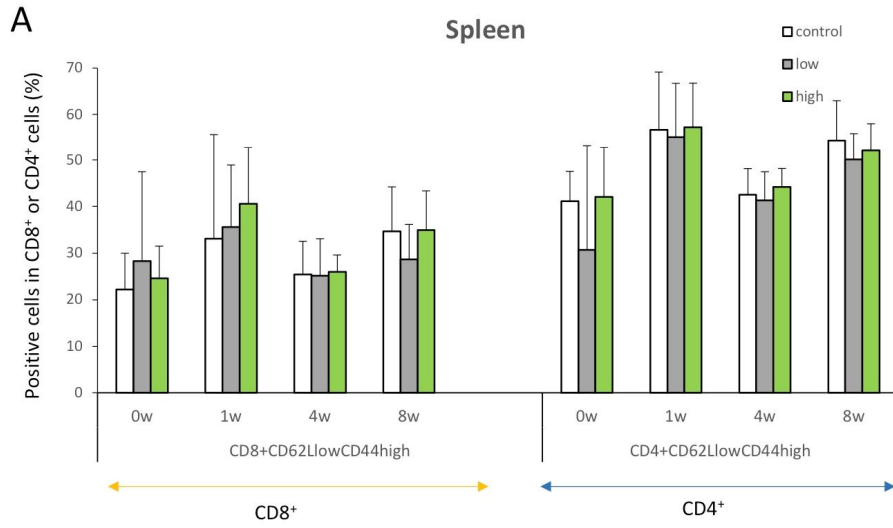


图12

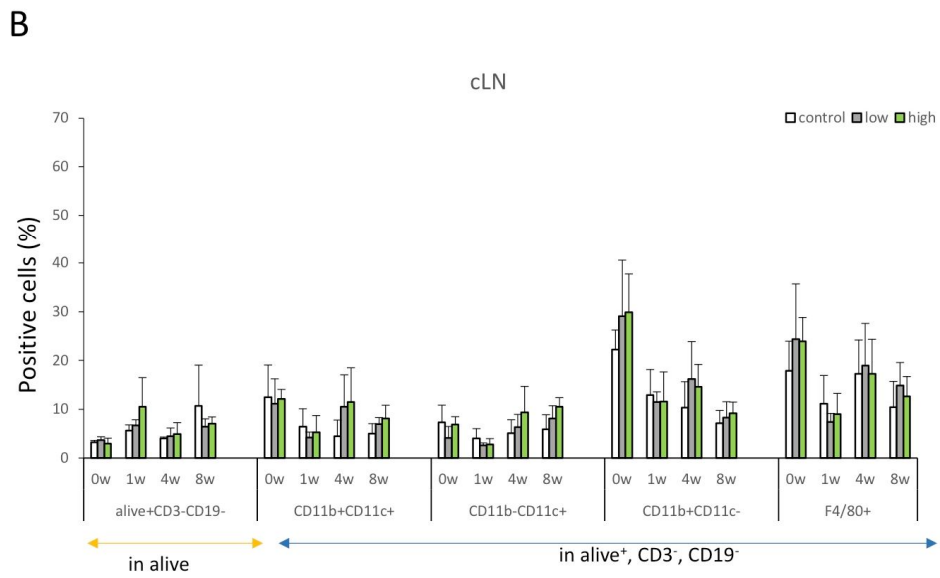
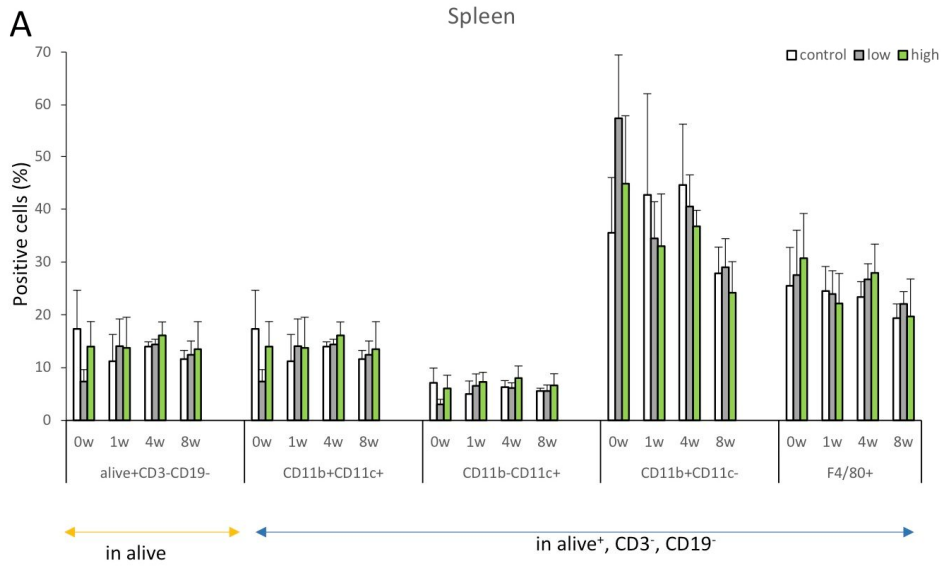


Figure 13

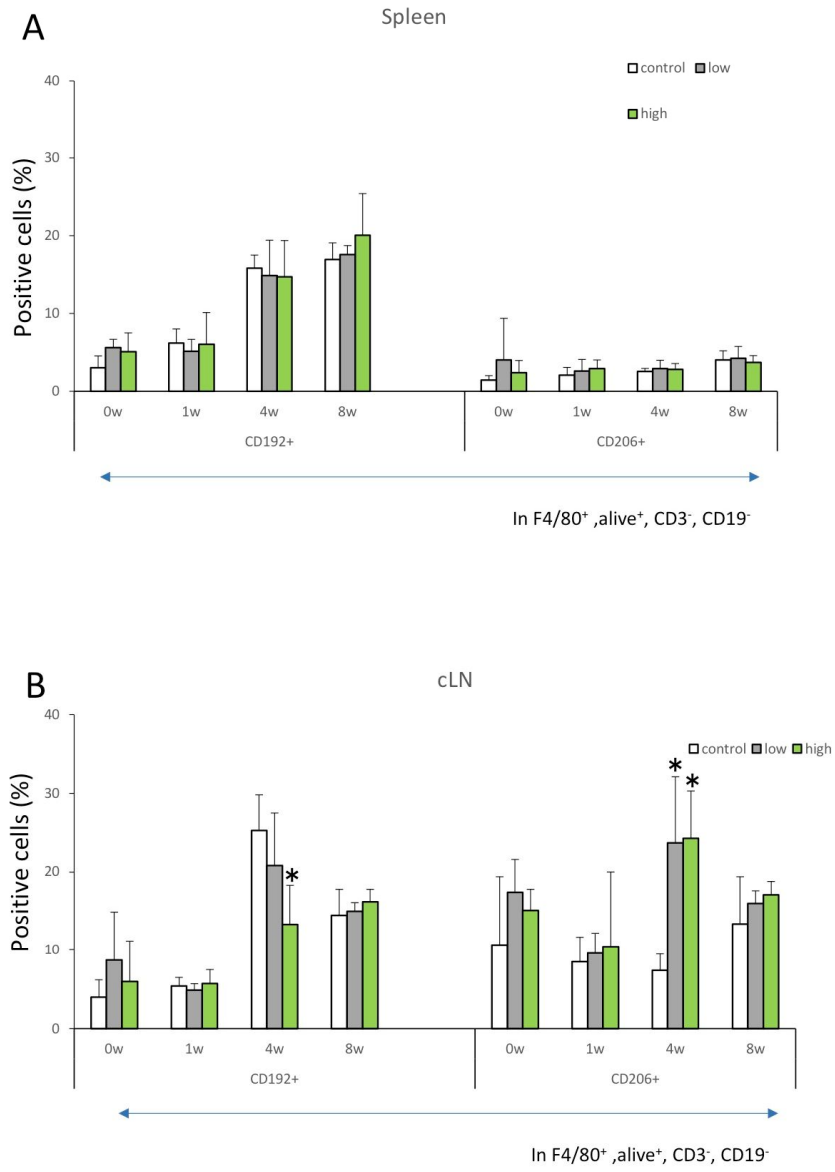
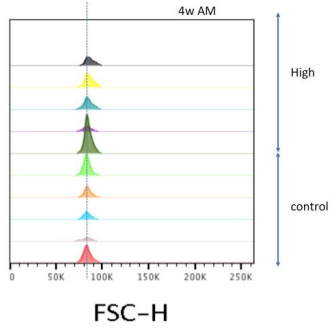


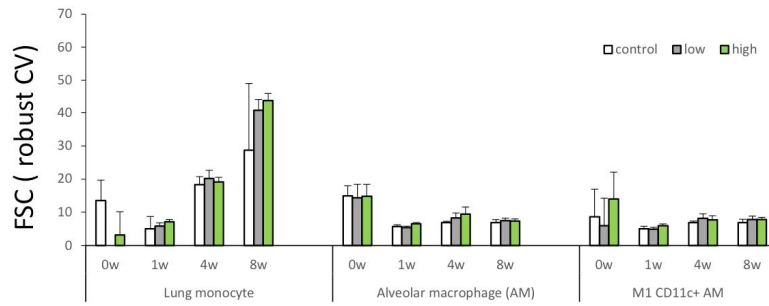
图14

A Difference of FSC value of BALF in control and high dose treated mice



| Sample Name | Subset Name | Count |
|-------------|-------------|-------|
| 33171.fcs | AM | 1157 |
| 33169.fcs | AM | 1885 |
| 33161.fcs | AM | 1636 |
| 33151.fcs | AM | 770 |
| 33163.fcs | AM | 3915 |
| 33155.fcs | AM | 2205 |
| 33153.fcs | AM | 1264 |
| 33145.fcs | AM | 940 |
| 33149.fcs | AM | 650 |
| 33143.fcs | AM | 1916 |

B



BALF

C

