

平成 30 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、Taquann 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) ならびに二酸化チタン (T-TiO₂) を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、0、1、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 の曝露直後では肺胞マクロファージの生細胞数は減少し、その後細胞数が回復することがわかったが、マクロファージサブセットでは M1 型のマクロファージの割合が増加していた。また、T-CNT7 の曝露によって好酸球ならびに単球の細胞数が増加することが判明した。一方で、ナノマテリアルの吸入曝露によって肺胞マクロファージにおける CD36 などのスカベンジャー受容体を介した反応が重要であることが示された。加えて、T-CNT ならびに T-TiO₂ 曝露によって、肺胞洗浄液細胞における MMP12 遺伝子の発現亢進が見られた。さらに、肺組織での遺伝子変化では T-CNT7 および T-TiO₂ の曝露で共通の遺伝子変化 (MMP12, CD204, IL-6, IL-33, TIMP-1 などの上昇) とともに異なった遺伝子の変化も観察された。異なったナノマテリアルの曝露によって、肺組織内での免疫反応は関連遺伝子の発現に影響が及ぶことが判明した。したがって、ナノマテリアルの形態あるいは性状によって肺胞マクロファージの処理反応は異なっており、繊維状の多層カーボンナノチューブは貪食反応に異常を来し「Frustrated phagocytosis」が誘導されている可能性が考えられた。ナノマテリアルに対する肺免疫システムの影響評価について今後さらに多角的な検討が必要であると考えられる。

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 (Mφ) 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 30 年度の実験では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブならびに二酸化チ

タンを用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、0、1、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、ナノマテリアルの暴露による生体影響評価を検討した。特に、肺胞マクロファージに焦点を当て、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に検討を加えた。

B. 研究方法

・マウス

12週齢のC57BL/6(雄)を用い、各群6匹ずつで多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)あるいは二酸化チタン(T-TiO₂)を吸入暴露装置(国立医薬品食品衛生研究所)により吸入を実施し、吸入後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、ナノマテリアルの暴露・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。

・MWCNT-7, TiO₂ (AMT-600)

多層化カーボンナノチューブはMWCNT-7(保土ヶ谷化学)、二酸化チタンはAMT-600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, 3mg/m³; 2hr/day/week, 5週間)AMT-600(T-TiO₂, 30mg/m³; 2hr/day/week, 5週間)を用いた。対照群はフィルターを通したキャリーエア吸入とした。

・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

BALF細胞および肺組織の一部を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',	reverse,
5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3',	Col IV; forward,
5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3',	reverse,
5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3',	GM-CSF;
forward,	5' -CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA-3',
reverse,	5'-CAGCTTGTAGGTGGCACACA-3',
IL-6;	forward,
5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3',	reverse,
5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3',	IL-33; forward,
5'-ATTTCCCCGCAAAGTTCAG-3',	reverse,
5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3',	MMP12;
forward,	5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',
reverse,	5'-GGTTTGTGCCTTGAAAAGTCTTTAGT-3',
TIMP-1;	forward,
5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3',	reverse,
5'-AGGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3',	VEGF; forward,
5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3'	reverse,
5'-GTTCCCCGAAACCCTGAGGAG-3',	β-actin;

forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

C. 研究結果

正常 B6 雄 (12 週齢) マウスに T-CNT7 暴露群、T-TiO₂ 暴露群および対照群として、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (図 1A)。各群は 6 匹ずつとする。

BALF 細胞のフローサイトメータ解析についてのゲーティングは FSC/SSC から生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、CD3⁻CD19⁻7AAD⁻細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺胞マクロファージ (AM)、好酸球 (E)、単球 (M) に分類した (図 1B)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1 (CD192) あるいは M2 (CD206) マクロファージサブセットの検出を行った (図 1B)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討してみた。通常、肺胞マクロファージは F4/80⁺CD11b⁻ の表現型を示し、前年度までの報告では T-CNT7 の吸入暴露で F4/80⁺CD11b⁺ あるいは CD11b^{high} の分画が増加することがわかっている。この分画は M1 マクロファージの性格を有していることも知られている。

BALF 中の各免疫担当細胞についてフローサイトメータによる解析では、暴露直後 (0 週) で生細胞 (alive) が T-CNT7 暴露で低下しており、肺胞マクロファージ (AM) においても T-CNT7 暴露で低下していた (図 2A)。一方で、好酸球、単球は T-CNT7 暴露で増加していたが、(図 2A) 好酸球は全体として割合が低く、0 週ならびに 1 週での変化にとどまっていたことから、繊維状のナノマテリアルに対する初期の免疫反応に関与している可能性がある。T-TiO₂ 暴露では、対照群と変化はなかった (図 2A)。さらに、肺胞マクロファージ表面マーカーで検討すると、T-CNT7 暴露で F4/80⁺肺胞マクロファージあるいは CD11b⁻F4/80⁺肺胞マクロファージは、対照群あるいは AMT-600 暴露群に比較して減少するものの、CD206⁺あるいは CD11b⁺F4/80⁺マクロファージは逆に増加することがわかる (図 2A)。

肺胞マクロファージのこれらの BALF 細胞の分画の傾向は暴露後 1 週、4 週まで続くが、T-CNT7 暴露後 1 週では肺胞マクロファージ中の CD206⁺マクロファージ (M2) の増加が見られなくなり、暴露後 4 週でも同様であった (図 2B, C)。T-CNT7 暴露後 4 週では好酸球の増加が見られなくなった (図 2C)。暴露後 8 週では、各群で大きな変化が見られなくなったが、T-CNT7 暴露で単球の増加、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加は続いていた (図 2D)。

ナノマテリアル暴露後の経時的变化を検討すると、肺胞マクロファージは対照群で大きな変化はないが、暴露後 8 週でやや減少傾向が見られた (図 3A)。T-TiO₂ 暴露群では 8 週まで変化は見られなかった (図 3A)。T-CNT7 暴露群では減少した肺胞マクロファージは 4 週、8 週と経時的に増加していた (図 3A)。

T-CNT7 暴露で特徴的な好酸球の経時的变化に関しては暴露後 0 週、1 週まで増加し、4 週、8 週で低下し、対照群と差が見られなくなった (図 3B)。単球の変化では T-CNT7 暴露で増加が 4 週まで続き、その影響が 8 週まで持続していた (図 3C)。

肺胞マクロファージの各分画についての経時的变化を検討すると、M1 型マクロファージに含まれる CD11b⁺F4/80⁺マクロファージに関しては、T-CNT7 暴露群では、暴露後 0 週、1 週での増加が目立ち、4 週、8 週と低下していた (図 4A)。T-TiO₂ 暴露群では対照群に比較して、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加は軽微であった (図 4A)。いずれの群でも暴露後 1 週以降では CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの割合は経時的に減少していた (図 4A)。

一方、M2 型肺胞マクロファージは対照群、T-TiO₂ 暴露群でばらつきはあるものの、8 週まで低い割合を維持していた (図 4B)。

ナノマテリアルの暴露による変化で、肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体が重要な役割を果たしていることが知られていることから、肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現を検討すると、対照群において暴露直後で 20% 程度が陽性であった発現が 1 週以降はほぼ発現が認められなかった (図 5A)。T-TiO₂ 暴露

群では、暴露直後に対照群よりも高い CD36 発現を示し、1 週後以降で発現は見られなくなった(図 5A)。T-CNT7 暴露においても同様の発現変化が観察された(図 5A)。CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおいても CD36 の発現はナノマテリアルの暴露直後で発現が亢進するが、1 週以降ではほぼ発現が見られなくなった(図 5B)。0 週での T-TiO₂ 暴露群と T-CNT7 暴露では CD36 の発現に差は見られなかった(図 5A, B)。また、スカベンジャー受容体の一つである CD163 の発現に関しても経時的に検討したが、若干の時間的な変化は見られるもののマクロファージの 5% 以下の発現しか見られなかったことから CD163 分子の発現に両マテリアルの影響は低いものと考えられる(図 6A, B)。

ナノマテリアル暴露による BALF 細胞における各種 mRNA 発現に関して定量 RT-PCR にて検討したところ、昨年の T-CNT7 暴露で変動のあった MMP12 遺伝子に関して、対照群、T-TiO₂ 暴露群では変化は見られなかったが、T-CNT7 暴露群で 0 週および 1 週で発現上昇が観察され、4 週、8 週では発現が低下するものの対照群よりは高い値を維持していた(図 7A)。さらに、スカベンジャー受容体の一つである CD204 においても T-CNT7 曝露によって発現が上昇し、暴露後 1 週では高い発現を示した後、4 週以降で発現低下が見られた(図 7B)。

肺組織における様々な遺伝子の mRNA 発現に関しては、MMP12 mRNA 発現は T-CNT7 暴露後 1 週で高い値を示していた(図 8A)。CD204 mRNA は T-TiO₂ 曝露後 1 週で上昇し、それ以降は低下していた(図 8B)。T-CNT7 暴露では直後から発現が上昇し、4 週で一旦低下し、8 週で再び上昇していた(図 8B)。また、MMP12 mRNA 発現に関しては、T-CNT7 暴露後 1 週では肺組織の方が相対的に発現量が高いことがわかる(図 7A, 8A)。加えて、CD204 mRNA 発現に関しては、T-CNT-7 暴露後 1 週で、BALF 細胞での発現が肺組織よりも相対的に高い発現を示していた(図 7B, 8B)。

肺組織における GM-CSF mRNA 発現は T-CNT7 暴露後 1 週で上昇していたがその後は低下した(図 9

A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(図 9B)。IL-33 mRNA 発現においても、T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇がみとめられた(図 10A)。慢性炎症の線維化に關与する Col IV mRNA はナノマテリアルの暴露で変動は認められなかった(図 10B)。

TIMP-1 mRNA 発現では T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(図 11A)。VEGF mRNA 発現はばらつきはあるものの、大きな変化は認められなかった(図 11B)。

D. 考察

今年度の実験では正常 B6 雄マウスに二酸化チタン(T-TiO₂)および多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を Taquann 処理によって分散性を高めた上で、全身吸入暴露装置にて 4 週間にわたって暴露を行なった。暴露後、0 週、1 週、4 週および 8 週における肺を中心とした免疫担当細胞の動態と異なったナノマテリアル吸入暴露による免疫反応の違いを詳細に検討した。

ナノマテリアルの 4 週間の暴露直後(0 週)では、T-CNT7 の暴露群では BALF 細胞の生存割合が対照群、T-TiO₂ 暴露群に比較して、有意に低くなっていた。このことは昨年までの研究結果と一致している。T-TiO₂ 暴露群では形態学的に顆粒状異物を貪食した肺胞マクロファージが多く観察されている(相磯班内データ)。一方で、T-CNT7 は針状あるいは繊維状の形態のナノマテリアルであり、貪食しようとした肺胞マクロファージは細胞死を生じている可能性が考えられた。従来よりナノマテリアルの貪食と「Frustrated phagocytosis」との関連性が報告されてきたが、T-CNT7 暴露後に肺胞マクロファージによるナノマテリアルの貪食反応が進む過程で、エキソサートーシスの亢進、小胞体やゴルジ装置などの細胞小器官に機能的あるいは形態的变化から Frustrated phagocytosis が誘導され、その後、細胞死が生じ、処理しきれなかったナノマテリアルに対して新たに肺胞マクロファージの反応が繰り返しながら、肺全体の免

疫反応に変化が生じている可能性が考えられる。

暴露直後以降、T-CNT7 暴露群では BALF 細胞数あるいは肺胞マクロファージ数が回復し、暴露後 8 週ではほぼ対照群、T-TiO₂ 暴露群と大差はなくなっていた。T-CNT7 暴露にて細胞死に陥った肺胞マクロファージは肺組織内での恒常性維持あるいは貪食しきれなかったナノマテリアルの処理のために肺胞内で細胞数が増加している可能性が考えられる。組織常在型マクロファージが増加したのかあるいは末梢由来の単球から分化することで細胞数が増加したのかは不明であり、今後の課題である。

多層化カーボンナノチューブの暴露後 1 年での肺胞マクロファージのフェノタイプとして、CD11b^{high} F4/80⁺マクロファージが増加し、線維化に関係する MMP12 を産生することが報告されている [Otsuka et al. G. 発表論文 1. 発表論文 (3)]。今回の実験においても CD11b^{high} 分画を含む CD11b⁺ 分画が T-CNT7 暴露群で増加していたことから、暴露後早い段階からこのユニークな分画が多層化カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫反応に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、明確な CD11b^{high} 分画への変化はさらに加齢的な変化が必要であることが考えられた。

T-CNT7 暴露での変化で重要な所見として、好酸球数の増加である。通常、好酸球はアレルギー反応、寄生虫感染などの免疫反応においてその役割が知られているが、ナノマテリアルの暴露による好酸球の役割に関してはよく知られていない。IL-13 など好酸球が産生するサイトカインあるいはケモカインなどの産生を検討する必要性がある。

T-TiO₂ および T-CNT7 の両者ともに暴露後に肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現が亢進していた。このことはナノマテリアルの形状ならびに性状に関わらずスカベンジャー受容体がナノマテリアルに対する免疫反応に重要な働きをしていることが示された。CD35 の発現は肺胞マクロファージ全体と CD11b⁺F4/80⁺マクロファージとでほぼ発現量が同じであったことから、この分画における CD36 の発現がナノマテリアルの反応

に鍵になる可能性が示された。

BALF 細胞の遺伝子変化として、T-CNT7 暴露群で MMP12 および CD204 mRNA 発現が上昇していた。MMP12 に関してはこれまでの報告に一致しており、T-CNT の暴露によって肺胞マクロファージの産生する MMP12 が肺の線維化病変に関与しているものと考えられる。また、CD204 に関してはスカベンジャー受容体の一つとして知られており、T-CNT の暴露に関連する分子として注目できる。また、T-CNT7 暴露で BALF 細胞の CD204 mRNA 発現が肺での発現よりも高い発現であったことから、肺胞マクロファージにおける CD204 分子の発現は重要であることが示唆される。

肺組織における遺伝子変化に関しては、BALF 細胞と同様に、MMP12 ならびに CD204 mRNA 発現の上昇が見られたが、肺組織への肺胞マクロファージの残存あるいは肺胞マクロファージ以外の間質の細胞の変化が反映されている可能性が考えられた。また、T-TiO₂ 暴露でも CD204 mRNA の発現上昇が見られたことから、何らかの間質細胞への影響が考えられた。特に、MMP12 mRNA の発現に関しては、T-CNT7 暴露後 1 週で BALF 細胞よりも肺組織で相対的に高い発現を示していたことは、肺胞マクロファージでの MMP12 の役割に加え、肺組織における別の細胞における MMP12 の発現がナノマテリアルの暴露時における肺全体の反応に影響を示している可能性が考えられた。

肺組織でのサイトカインの変化に関しては、T-CNT7 暴露 1 週間で一過性に GM-CSF ならびに IL-6 mRNA 発現が上昇しているが、BALF 細胞での発現の解析が必要である。また、T-TiO₂ 暴露と T-CNT7 暴露で IL-33 mRNA 発現が一過性に上昇していることも BALF 細胞での発現の解析が待たれる。TIMP-1 mRNA 発現に関しても両方のマテリアルで一過性に上昇しており、ナノマテリアル暴露での肺免疫に重要な役割を果たしている可能性が示された。暴露後 1 週での遺伝子変化がナノマテリアルの暴露の初期反応を反映している可能性があるが、単回暴露など実験の条件を考慮した実験計画が今後の課題

である。

一方で、今回の実験における組織学的検討ならびに BALF 細胞の解析で、T-CNT7 暴露によって末梢気道あるいは肺胞における異物貪食細胞の変性、集簇、間質での線維化など多彩な所見が観察されたが、フローサイトメータや遺伝子発現解析の結果で見られたような肺胞マクロファージの一過性の分画変化、遺伝子発現変化を反映しているか否かはさらなる今後の検討が必要であると考え。さらに、T-CNT7 に比較して T-TiO₂ 暴露では組織学的に大きな変化が見られなかった点は、免疫学的解析結果と一致していたことから、ナノマテリアルの形状や性状による肺における免疫反応の違いが示されている。

また、「Frustrated phagocytosis」が今回の研究でどのように関与しているのかを明らかにするためにも、今後の実験計画での暴露プロトコール、解析項目に細胞小器官の解析などより詳細な内容を加える必要がある。

E. 結論

1. ナノマテリアルの形態あるいは性状によって肺胞マクロファージの処理反応は異なっており、繊維状の多層化カーボンナノチューブは貪食反応が正常に機能できない可能性がある。
2. 多層化カーボンナノチューブの暴露直後では肺胞マクロファージ数は減少し、その後細胞数が回復することがわかった。
3. 多層化カーボンナノチューブの暴露によって好酸球の細胞数が増加することが判明した。
4. ナノマテリアルの吸入暴露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体を介した反応が重要であることが示された。
5. ナノマテリアルの性状や形態の違いによって、BALF 細胞あるいは肺組織での遺伝子の発現変化が異なっていることがわかった。
6. 種々のナノマテリアルの暴露によって肺での免疫機能評価には BALF 細胞の細胞表面マーカーや遺伝子発現の変化の検討が重要であることがわかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2019 Apr;121:29-41 doi: 10.5152/eurjrheum.2019.18137.

(2) Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2018.02594.

(3) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10):e0205702, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0205702

(4) Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018 doi: 10.1111/jop.12756

(5) Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(5):E1462, 2018 doi: 10.3390/ijms19051462

(6) Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation*. 2018

Aug;41(4):1172-1181. doi:10.1007/s10753-018-0764-0.2 .

(7) 石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂 第 3 版 (2018 年) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

(8) 石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 病理と臨床 36(6), 580-585, 2018

(9) 牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群研究の最前線 細胞 50(10), 528-531, 2018

(10) 石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞 医学のあゆみ Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

学会発表

(1) Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo: Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International Sjogren's Syndrome Symposium, Washington DC, April 18-21, 2018

(2) Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing resident macrophages enhance autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(3) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Masako Saito, Satoko Kujiraoka, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Hidehiro Kishimoto, Naozumi Ishimaru: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(4) Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Akiko Yamada,

Aya Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Jonathan Sprent, and Naozumi Ishimaru. NF-κB2 Controls the Migratory Activity of Memory T Cells to the Target Tissues in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(5) 石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(6) 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(7) 中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺におけるIL-33の発現とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(8) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

(9) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

(10) 沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルにおけるNotchシグナルの役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(11) 常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大

- 塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄 DNAライセンシング因子CDT1の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (12) 西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 Emi1の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (13) 梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔癌におけるPeriostinプライミングバリエーションの同定とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (14) Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018
- (15) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第17回四国免疫フォーラム 徳島 2018.6.30
- (16) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 分子病理学研究会37はがくれシンポジウム 佐賀 2018.7.7
- (17) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 先端歯学スクール2018 東京 2018.8.23-24
- (18) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 第29回日本臨床口腔病理学会総会 東京 2018.8.25-26
- (19) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018.9.5-7
- (20) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (21) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (22) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat 香川(リゾートホテルオリビアン小豆島) 2018.9.20-22
- (23) Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (24) Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing

macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡
2018.12.10-12

- (25) Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (26) 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、多層化カーボンナノチューブ長期暴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
- (27) 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
- (28) 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

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

図1A 実験計画

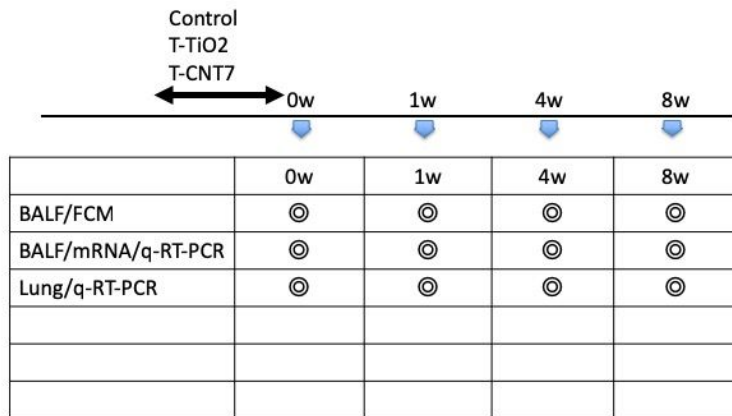
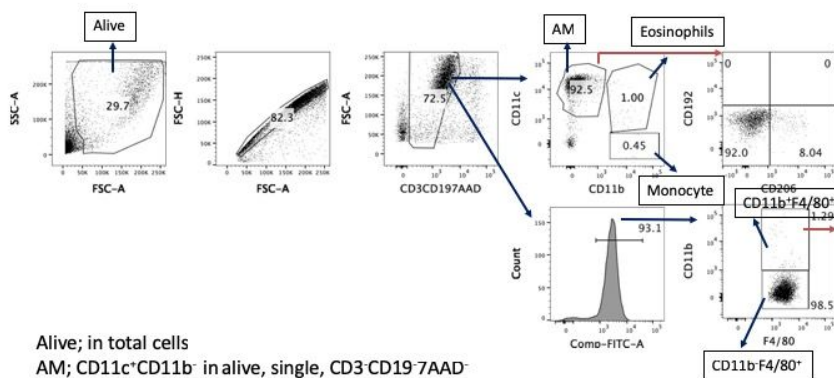


図1B フローサイトメータ解析
(ゲーティングストラテジー)



Alive; in total cells
 AM; CD11c⁺CD11b⁻ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 Eosinophils; CD11c⁺CD11b⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 Monocyte; CD11c⁻CD11b⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 F4/80⁺; F4/80⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻

図2A BALF中の各細胞分画

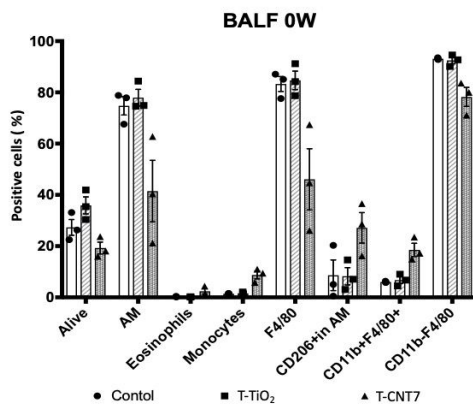


図2B BALF中の各細胞分画

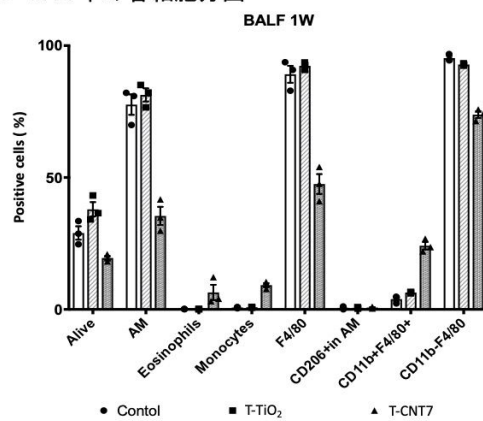


図2C BALF中の各細胞分画

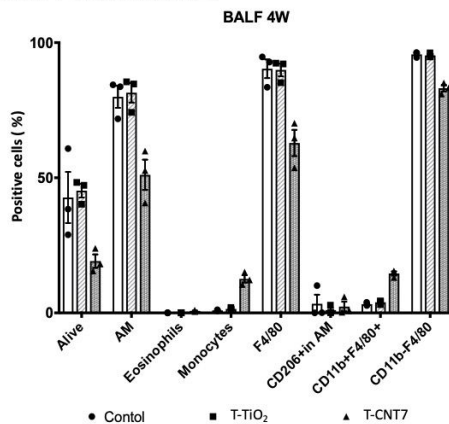


図2D BALF中の各細胞分画

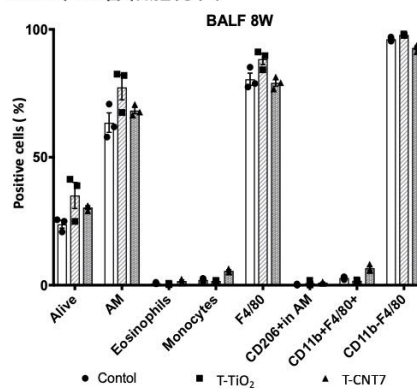


図3A

肺胞マクロファージの経時的変化

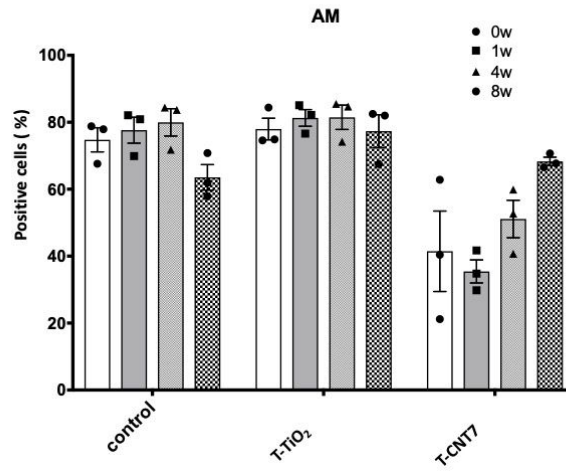


図3B

好酸球の経時的変化

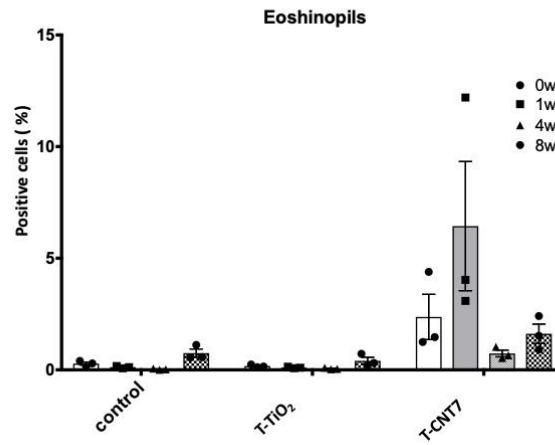


図3C

単球の経時的変化

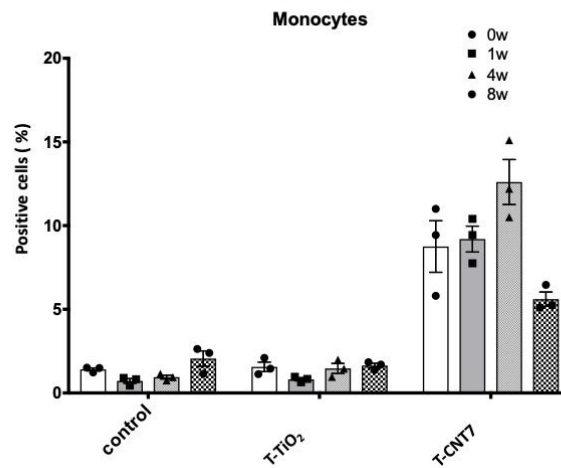


図4A CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージの経時的変化

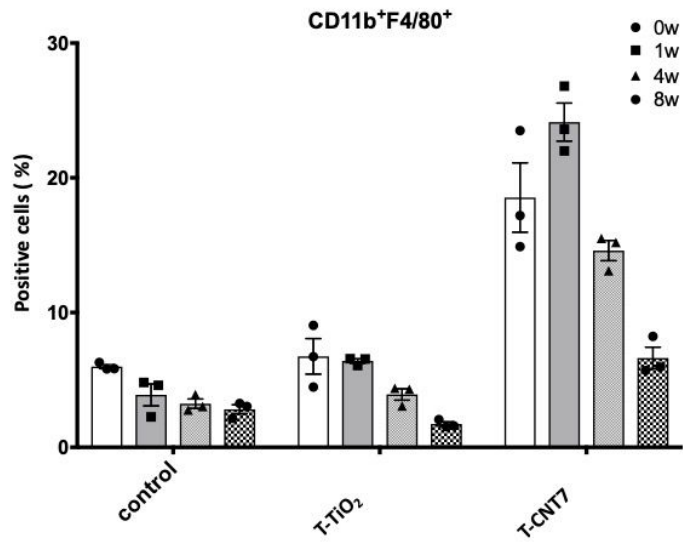


図4B M2型肺胞マクロファージの経時的変化

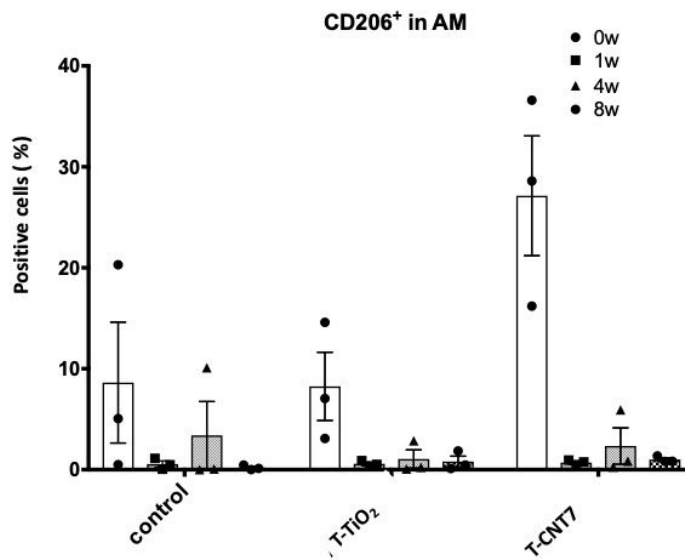


図5A

肺胞マクロファージにおけるCD36の経時的変化

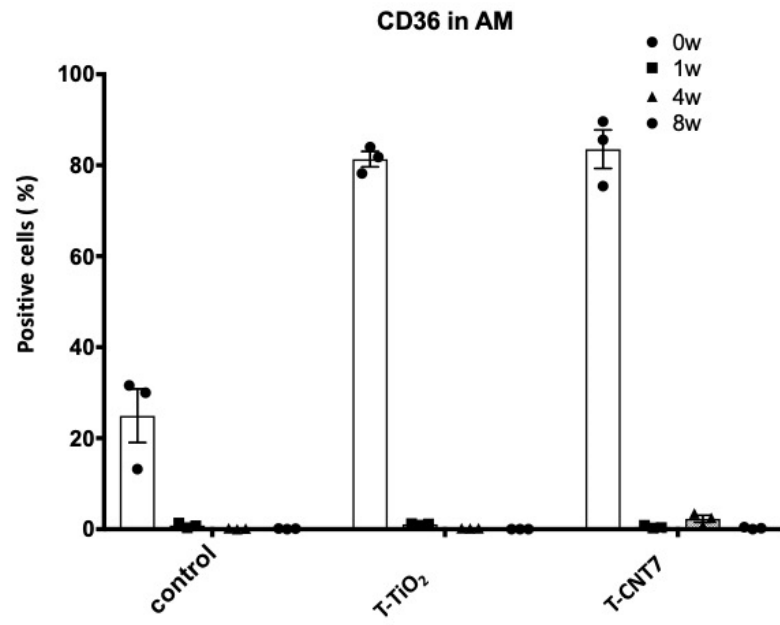


図6A 肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化

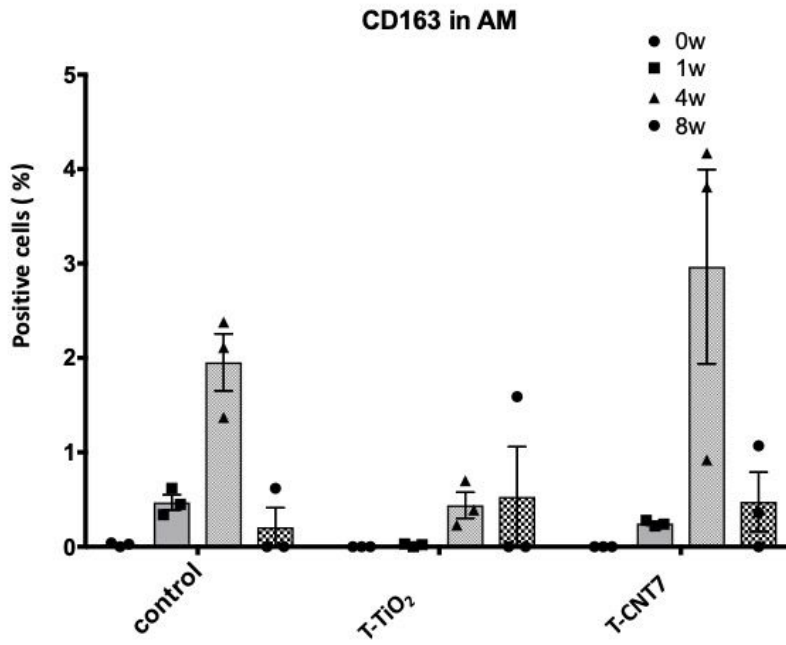
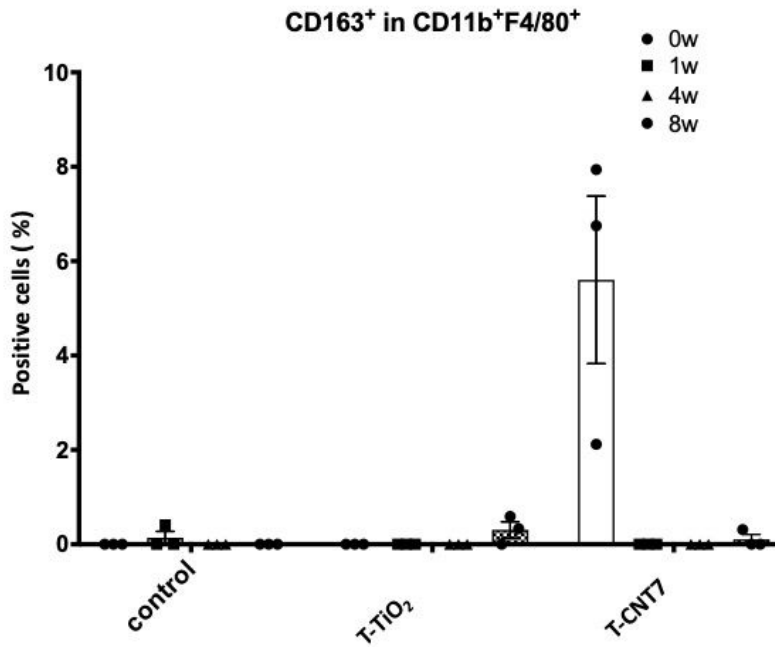


図6B CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化



BALF細胞におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

図7A

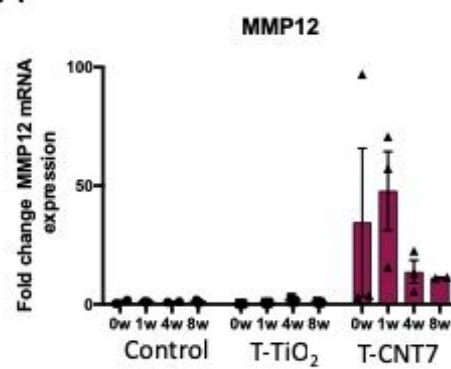
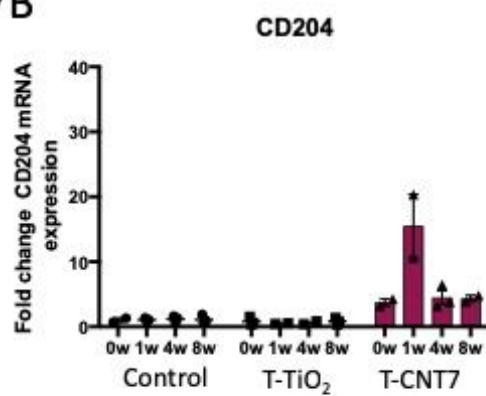
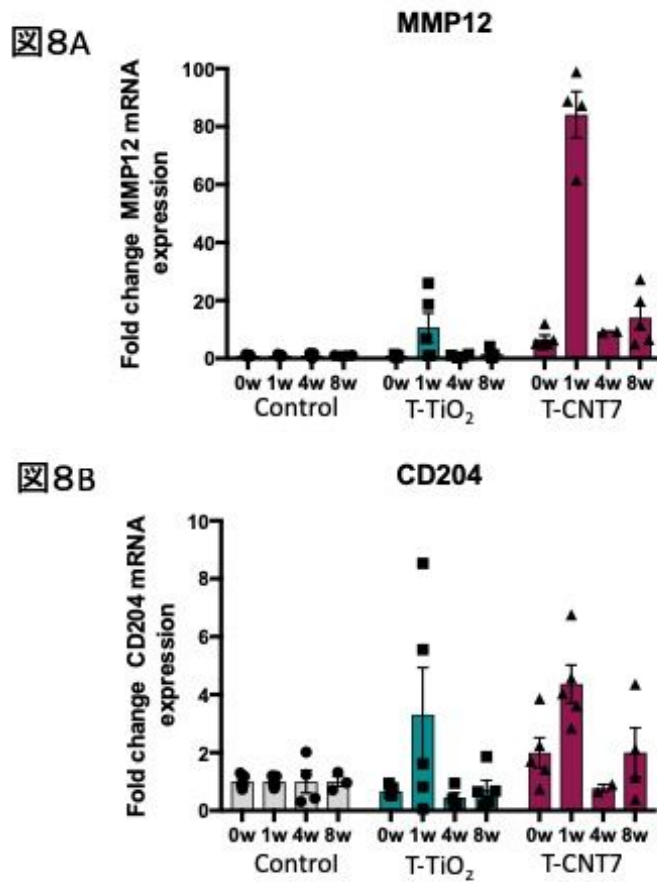


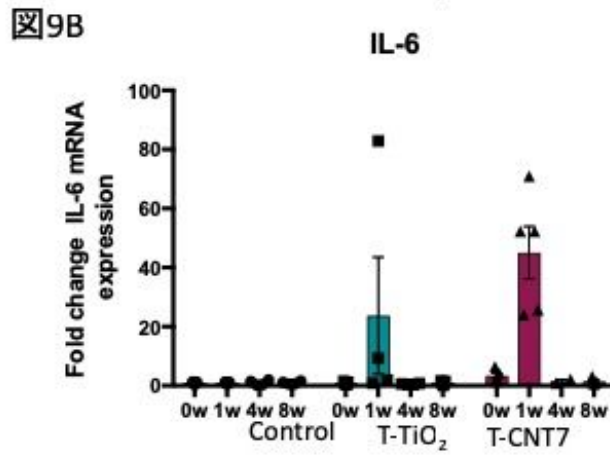
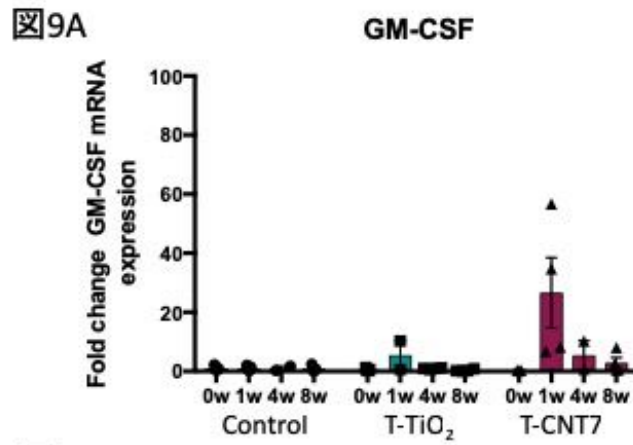
図7B



肺組織におけるMMP12およびCD204 mRNA発現



肺組織におけるGM-CSFおよびIL-6 mRNA発現



肺組織におけるIL-33およびColIV mRNA発現

図10A

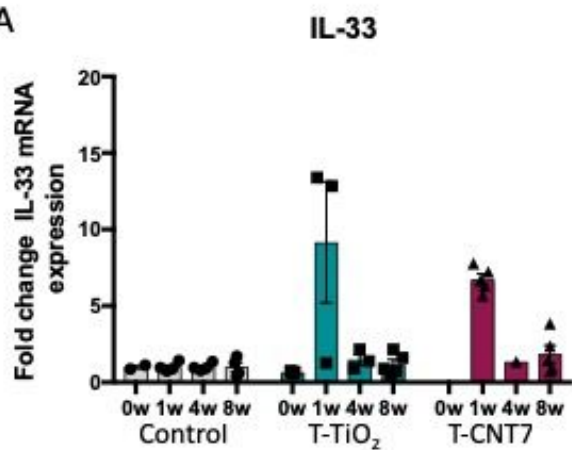
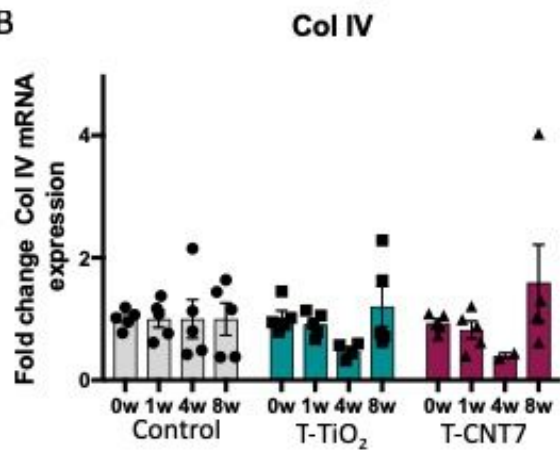


図10B



肺組織におけるTIMP-1およびVEGF mRNA発現

図11A

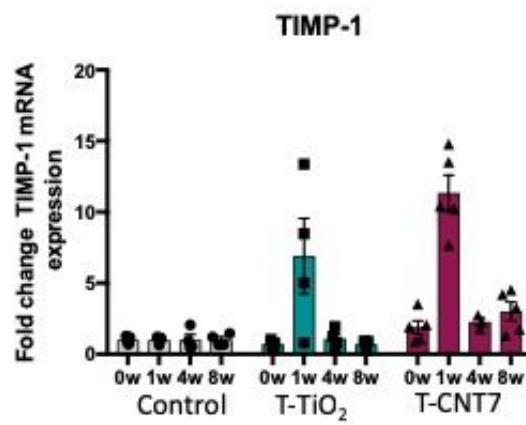


図11B

