

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

| | | | |
|-------|--------|----------------|----|
| 研究分担者 | 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 | |
| | 常松 貴明 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部 | |
| | 木野 倫子 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部 | |
| | 大塚 邦紘 | 徳島大学病院 | |
| | 菅野 純 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |
| | 高橋 祐次 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |
| | 横田 理 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |
| | 辻 昌貴 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |
| | 森田 紘一 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |
| | 菅 康佑 | 国立医薬品食品衛生研究所 | |

研究要旨

ナノマテリアル (NM) はその組成や形状によってマクロファージなどの貪食細胞の反応性は大きく異なっている。令和3年度の本分担研究では、令和2年度の研究に引き続いて、*in vivo* において針状酸化チタン (TiDW) の吸入曝露による肺の免疫システムに関して、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞を中心に細胞表面分子、サイトカイン、ケモカインおよび炎症関連分子の遺伝子およびタンパク発現を免疫学的手法にて検討を加えた。針状酸化チタンの吸入曝露実験では、肺胞マクロファージの分画に著変が見られなかったことから、ナノマテリアルの形状および性状によって免疫反応に相違がある可能性が示された。また、T-CNT および針状酸化チタンを用いた *in vitro* の実験によってマクロファージからの MMP-12 を介した慢性炎症機転が示唆された。さらに、針状酸化チタンの曝露で炎症性サイトカインの産生亢進の機序が考えられた。一方で、*in vitro* での RAW264.7 細胞を用いた検討では、TiDW 添加では細胞増殖、細胞毒性に大きな影響はなく、さらに、MMP12 の発現も観察されなかったことから、MWCNT でみられたマクロファージへの影響とは異なっていることが示された。以上から、NM の形状によってマクロファージの反応性は大きく異なっていることが明らかになった。

A. 研究目的

R3 年度の本研究では、昨年度から継続して実施している針状酸化チタンの全身吸入暴露による肺胞マクロファージを中心とした肺免疫システムへの影響に関して、免疫学的手法を用いて検討を加えた。また、多層化カーボンナノチューブおよび針状酸化チタンを *in vitro* での細胞株を用いた実験系にて MMP-12 を介した細胞の変化を詳細に検討した。ナノマテリアルの形状あるいは性状による免疫系の変化を詳しく検討することで、ナノマテリアルの毒性の評価系の確立を目指した。

B. 研究方法

R2 年度に実施した実験で得られたサンプル解析の継続を実施した。Taquann 処理した針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露後、4 週および 8 週での肺組織および BALF 細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法にて各種関連遺伝子 mRNA 発現を検討した。加えて、加えて、次年度に計画しているナノシリカ (NM-204) の全身吸入による肺免疫反応の解析を準備しており、これまでの NM 吸入暴露実験との比較検討を行う予定である。また、RAW264.7 細胞を用いて、T-CNT および FLT-300 (TiDW) を添加することによる細胞形態、増殖、MMP12 mRNA 発現を検討した。

以下に定量 RT-PCR で用いたプライマー配列を示す。MMP12; forward (f) 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse (r) 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', F4/80; (f) 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', (r) 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3', MCP-1; (f) 5'-CTGGATCGGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGAAAAGG-3', TLR-4; (f) 5'-CAGTGGTCAGTGTGATTGTGG-3', (r) 5'-TTCCTGGATGATGATGTTGGCAGC-3', IL-1 β ; (f)

5'-TGATGAGAATGACCTGTTCT-3', (r) 5'-CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA-3', IL-6; (f) 5'-GCTACCAAAGCTGGATATAATCAGGA-3', (r) 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3', IFN- γ ; (f) 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3', (r) 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3', IL-10; (f) 5'-ATCGATTCTCCCCTGTGAA-3', (r) 5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3', TGF- β ; (f) 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', (r) 5'-GGCGTATCAGTGGGGTTCAG-3', iNOS; (f) 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3', (r) 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3', CCR2/CD192; (f) 5'-CCATGCAAGTTCAGCTGCCT-3', (r) 5'-TGCCGTGGATGAACTGAGG-3', CD206; (f) 5'-GTACCTCACAGGATTAACCAGTTC-3', (r) 5'-CAGGGTTTAGTGACACACAGCTC-3', Tim4; (f) 5'-GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3', Arginase-1; (f) 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3', (r) 5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3', β -actin; (f) 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

(倫理面への配慮)

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国立医薬品食品衛生研究所および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。

C. 研究結果

TiDW の吸入暴露後 (図 1)、4 週および 8 週において肺組織における F4/80、iNOS、CCR2、CD206、Arg1、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 、TLR-4、CD54/ICAM-1、Tim4 の mRNA の発現は対照群と比較して変化はなかったが、TiDW 暴露後 8 週において、MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が対照群に比較して有意に上昇していた (図 2、3)。一方、BALF 細胞における F4/80、MCP-1、iNOS、CCR2、CD206、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、TLR-4、CD54/ICAM-1 および Tim4 mRNA 発現は TiDW 暴露で変化は認められなかったが、暴露後 4 週での MMP-12 mRNA 発現は対照群に比較して有意に上昇していた (図 4、5、6)。この結果は肺組織における MMP12 mRNA の発現上昇と一致する (令和 2 年度報告済み)。

RAW264.7 細胞への T-CNT および TiDW の添加による変化を観察すると、T-CNT の添加で細胞のサイズが対照細胞に比較して有意に大きくなっていったが、TiDW の添加では T-CNT 処理ほどは大きくなっていなかった (図 7)。また、TiDW 暴露によって細胞数あるいは生存率に影響は観察されなかった。加えて、T-CNT の添加で上昇していた MMP12 mRNA 発現は TiDW 刺激では上昇しなかった (図 8、9)。

D. 考察

TiDW 吸入暴露後 4 週にて肺組織ならびに BALF 細胞にて MMP12 mRNA 発現が上昇し、暴露後 8 週の肺組織で MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA 発現が上昇したことから、TiDW が肺内で暴露されると、肺胞マクロファージの MMP12 を介したが活性化が誘導され、その後炎症性変化が肺組織に広がっていった可能性が考えられる。In vitro では TiDW のマクロファージへの直接の作用

を確認すると、T-CNT で見られたような MMP12 発現上昇は確認されなかったことから、ナノマテリアルの形状や性状によってマクロファージの動態は大きく異なっていることが示唆された。

なお、本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかった。

E. 結論

マクロファージの MMP12 を起点と活性化機構がナノマテリアルの毒性評価法の確立に重要な位置を占めている可能性が考えられ、*in vitro* および *in vivo* の評価系を総合した毒性試験が必要であると考えられる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T. PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immunol.* 2022; 23(3):399-410. doi: 10.1038/s41590-021-01125-7.
2. Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa. *Inflammation.* 2022;45(3), 1348-1361. doi: 10.1007/s10753-022-01624-1
3. Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T. von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation. *J Cell Physiol.* 2021, 237(3):1964-1979. doi: 10.1002/jcp.30667

4. Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO. Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr.* 2021, 69(3):238-246.
5. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fosobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14943.
6. Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, Ishimaru N, Kamioka H. Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp 1a1 signaling axis. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14927
7. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly MC, Awasthi P, Takada K, Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8+ T cells in the cortex independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904. doi:10.1084/jem.20201904.
3. 石丸直澄 口腔科学を牽引する基礎研究の展望 日本補綴歯科学会 第 130 回記念学術大会シンポジウム (2021. 6. 20 ウェブ)
4. 石丸直澄, 新垣理恵子, 常松貴明, 高橋祐次, 菅野純 ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9 神戸)
5. 佐藤真美, 牛尾綾, 福田一稀, 俵宏彰, 大塚邦紘, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の病態探索 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
6. 田村海, 新垣理恵子, 太田康, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いたドライノーズ病態の解析 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
7. 俵宏彰, 新垣理恵子, 大塚邦紘, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いた M3PAM を用いた治療効果とその作用機序 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
8. 石丸直澄 基礎歯学研究的進化と展望 第 63 回歯科基礎医学会先端歯学国際教育ネットワークシンポジウム (2022.10.9 ウェブ)

F.2 学会発表

1. 新垣理恵子, 清水朱里, 佐藤真美, 俵宏彰, 常松貴明, 石丸直澄 唾液腺における常在型自然リンパ球の同定とシェーグレン症候群病態への関与 第110回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23東京)
2. 佐藤真美, 牛尾綾, 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 第 110 回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23 東京)
9. 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 HPV 陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明 第 57 回口腔組織培養学会学術大会 (2021.11.6 ウェブ)
10. Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)

11. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA sequencing reveals accumulation of CD4 and CD8 T cells with unique phenotypes in salivary glands of Sjögren's syndrome model mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1

実験プロトコール

In vivo実験

TiDW全身吸入



追加報告

フローサイトメーター解析 (BALF細胞、リンパ節、脾臓)
Q-RT-PCR解析 (BALF細胞、肺組織)
マルチプレックス解析 (BALF)

In vitro実験

RAW264.7

CNT/TiDW添加

24~48h

Cytology
Q-RT-PCR (関連遺伝子)

図2

TiDW吸入暴露後の肺組織におけるマクロファージ関連分子のmRNAの発現

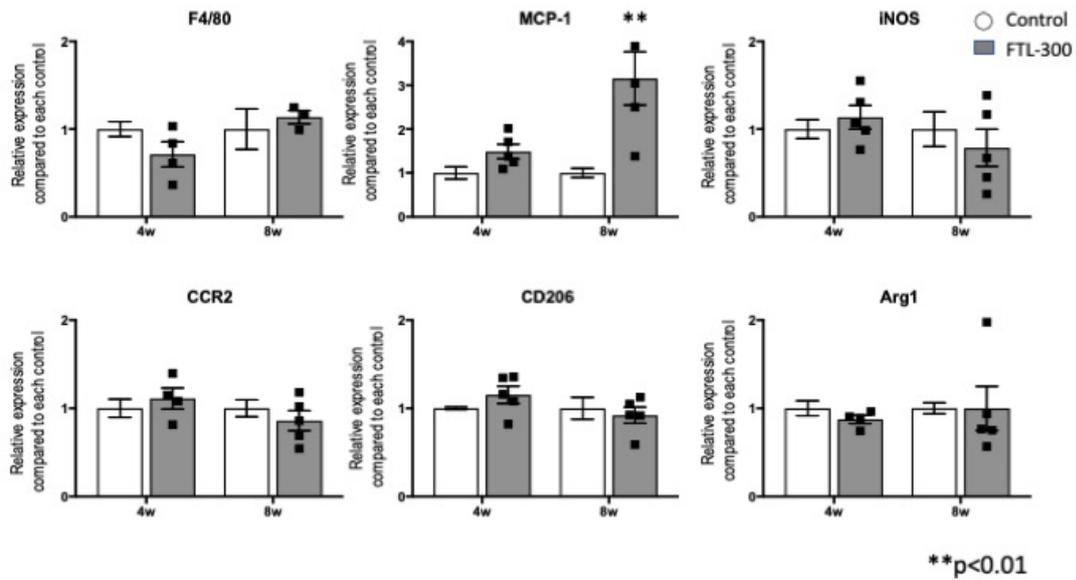


図3

TiDW吸入暴露後の肺組織におけるCytokineおよびTLR4 mRNAの発現

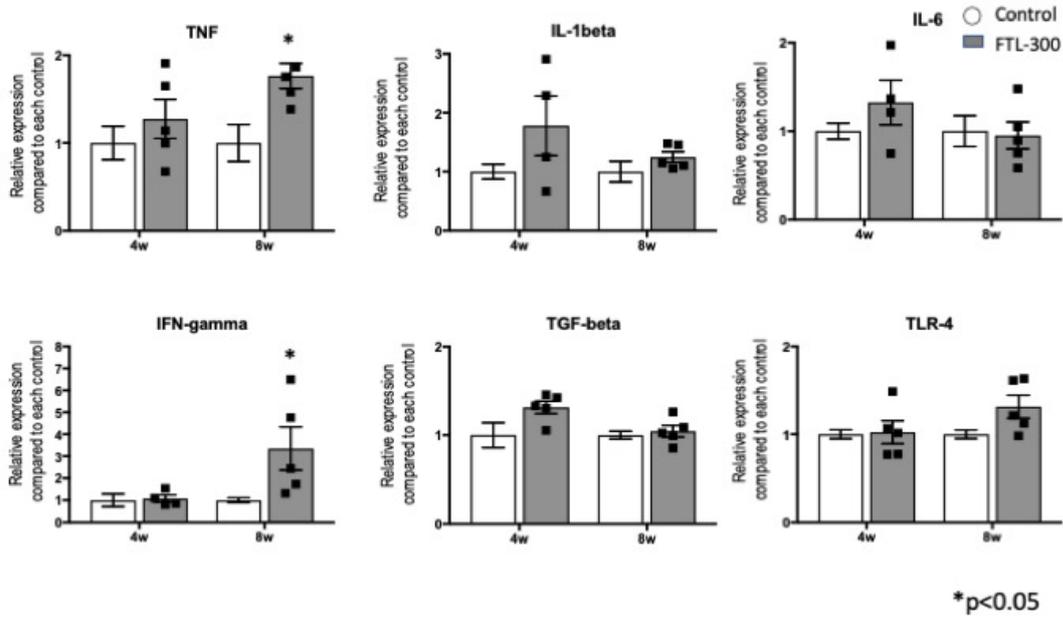


図4

TiDW吸入暴露後のBALF細胞におけるCD54 mRNA, Tim4 mRNA およびMMP12 mRNA発現

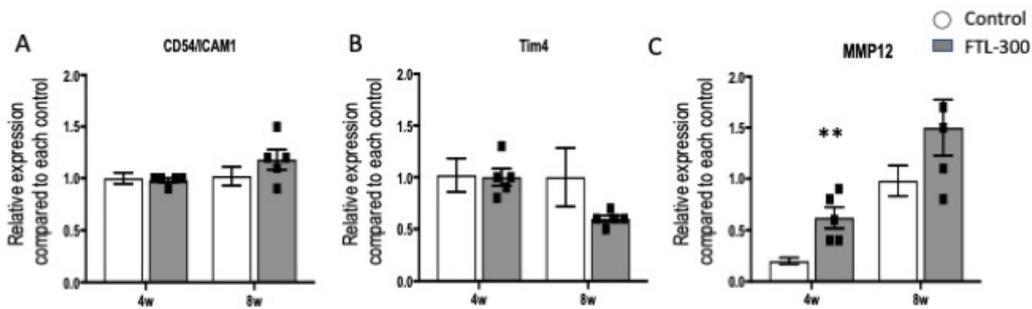


図4 TiDW吸入暴露後のBALFにおけるCD54 mRNA, Tim4 mRNAおよびMMP12 mRNA発現

A : CD54/ICAM-1 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5)

B : Tim mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5)

Tim4: T-cell membrane protein 4: a phosphatidyl serin receptor

C : MMP12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照に対する相対値)=平均値±SD (n=5), **p < 0.01

図 5

TiDW吸入暴露後のBALF細胞におけるマクロファージ関連分子のmRNA発現

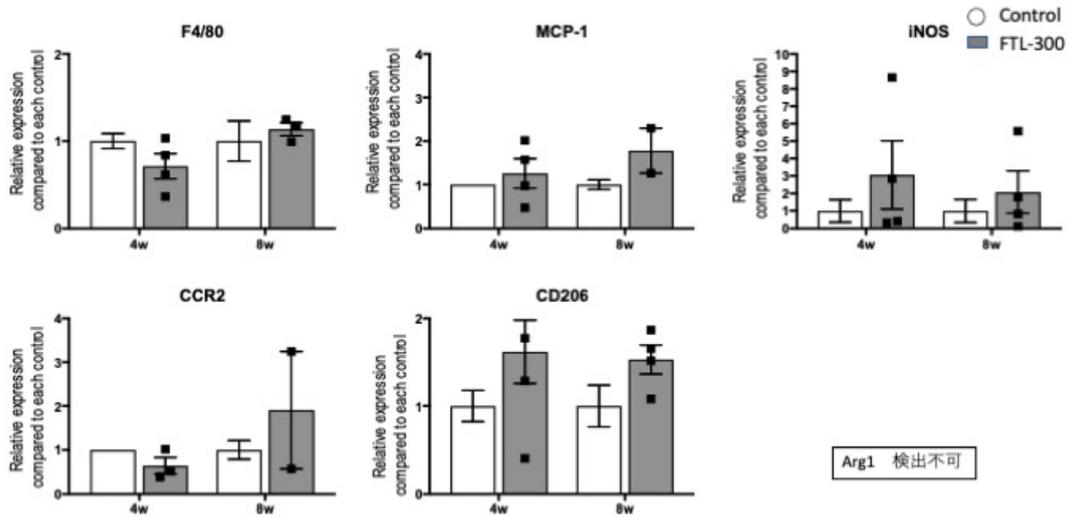


図 6

TiDW吸入暴露後のBALFにおけるCytokineおよびTLR4 mRNA発現

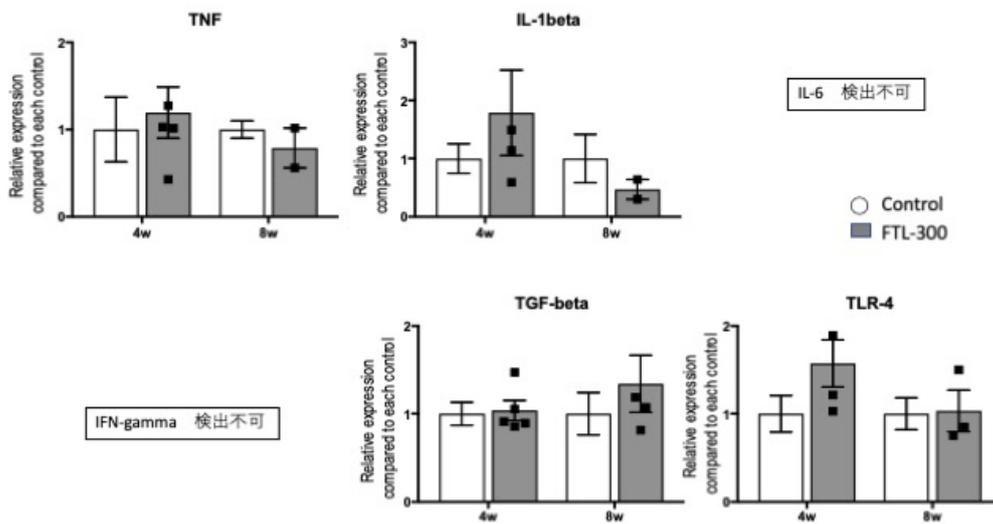


図 7

RAW264.7細胞へのT-CNTおよびFLT-300(TiDW)の影響

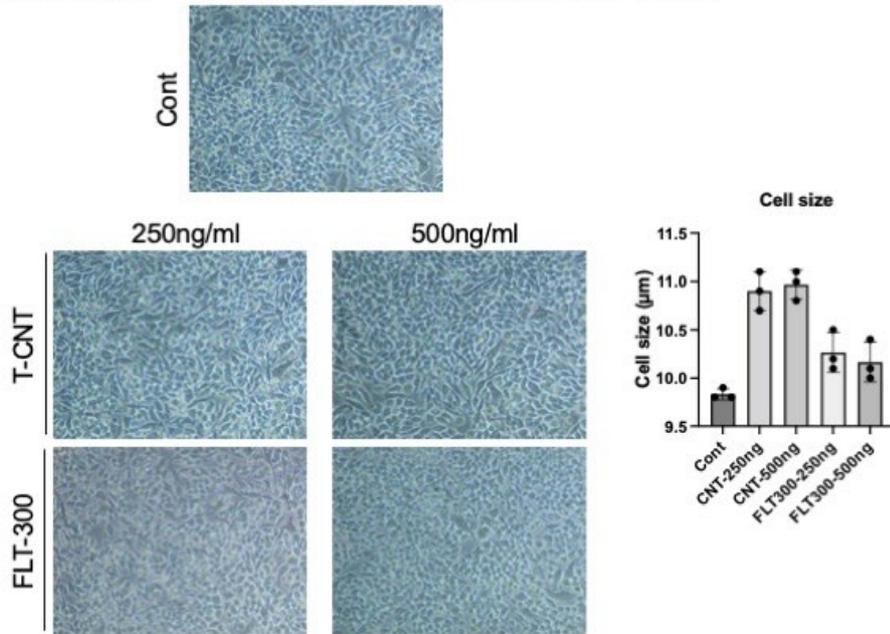


図 8

RAW264.7細胞へのT-CNTおよびFLT-300(TiDW)の影響

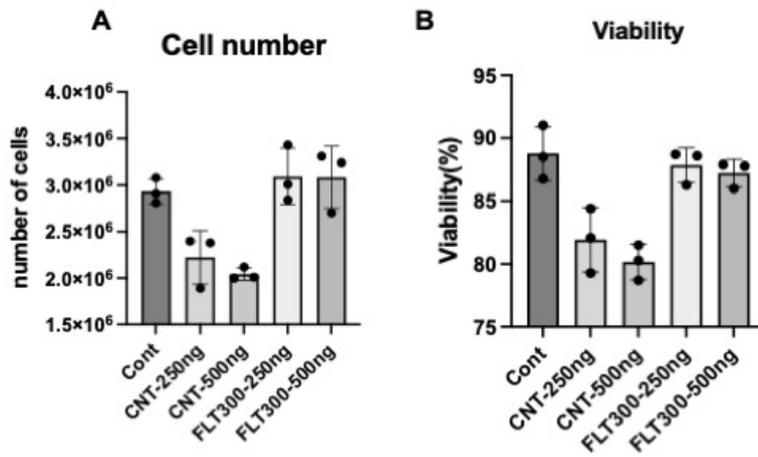


図9

RAW264.7細胞におけるTiO₂およびCNT暴露によるMMP12 mRNA発現

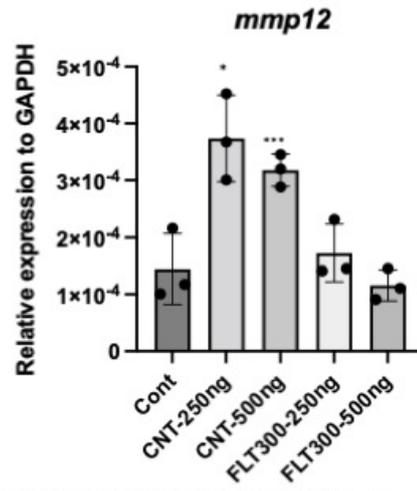


図9 MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果（GAPDHに対する相対値） = 平均値 ± SD (triplicate), *p < 0.05, ***p < 0.0005