

令和3年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業
分担研究報告書

研究課題:ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名:曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割に関する研究

研究分担者:渡部 徹郎 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者:小林 美穂 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教

研究協力者:菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員

公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究協力者:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

ナノマテリアルの産業応用が進展する中、健康被害の防止のために、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験により、曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布し、上皮間葉移行(EMT)や内皮間葉移行(EndoMT)の誘導を介して肺組織を変容させていくかについて時空間的な解析をする必要がある。

本分担研究では、曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割を明らかにすることを目的として、リンパ管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識した Prox1-GFP トランスジェニックマウスに対して、ナノマテリアルの吸入曝露実験を実施した。ナノマテリアルの吸入曝露を行ったマウスの肺組織においては、線維化のマーカである SM22 α と α SMA の発現と、EMT 誘導を介して線維化を引き起こす TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現が上昇することが明らかとなった。肺の微小環境における TGF- β は肺胞上皮細胞の EMT を誘導するのみならず、血管やリンパ管内皮細胞の EndoMT を誘導することが報告されている。今回 EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α SMA を発現する細胞 (EndoMT が誘導された細胞) が出現することを見出した。また、EndoMT が誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーである VEGFR2 の発現が維持されている細胞 (部分的 EndoMT が誘導されている細胞) と VEGFR2 発現が消失している細胞 (完全に EndoMT が誘導されている細胞) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分を FACS ソーティングし、EndoMT が段階的に進行していることを見出した。

今後、Prox1-GFP マウスを用いて曝露したナノマテリアルの体内分布におけるリンパ系の関与を明らかにしつつ、肺組織の変化を EMT と EndoMT を中心に検討する。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のために、ナノマテリアル吸入曝露による影響を評価するための効率的な慢性試験法を開発することは急務である。そのためにはヒトで想定される曝露経路に即した動物実験により、曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布していくか時空間的な解析をする必要がある。ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、曝露したナノマテリアルが肺胞から脈管系に移行していくことがこれまでの研究によって明らかとなっている。リンパ管は肺を含む全身に分布しており、末梢組織における体液や老廃物を汲み出し、末梢リンパ管から集合リンパ管・リンパ節を介して静脈へと還流することで全身の体液の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかし、ナノマテリアルの体内分布の変化におけるリンパ系の役割については未解明な部分が多い。

本分担研究では、曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割を明らかにすることを目的として、これまで観察が困難であったリンパ管をリンパ管内皮細胞特異マーカーである Prox1 遺伝子のプロモーターにより緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するトランスジェニックマウス (Prox1-GFP マウス: 参考文献参照) に対して、ナノマテリアルの吸入曝露実験を実施した。

さらに、血管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウス (血管レポーターマウス: Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) マウスから樹立した内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター細胞を用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の作用を検討した。

B. 研究方法

本年度では、東京医科歯科大学において

飼育していた Prox1-GFP マウスに対してナノマテリアルの全身曝露実験を行うために、三協ラボサービスにおいて繁殖を行った上で国立医薬品食品衛生研究所へと移動した。Prox1-GFP マウスの genotyping は定法に従って行い、PCR には下記のプライマーを用いた。

Prox1-GFP-F: GATGTGCCATAAATCCCAGAG CCTAT

Prox1-GFP-R: GGTCGGGGTAGCGGCTGAA

吸入曝露実験の検体は多層カーボンナノチューブ (NT-7) を用いた。対照群 (Ctrl 群、清浄空気のみ: 5 頭)、曝露群 (NT-7 群: 25 頭) の 2 群構成とした。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、1 日 6 時間 (10:00~16:00) の全身曝露吸入を単回行った。

肺組織のサンプリングは曝露開始後 0 日・1 日・3 日・6 日・14 日後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は RNA 抽出用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における遺伝子発現変化を検討するために線維化のマーカーならびに TGF- β 受容体の発現を定量的 RT-PCR を施行することで検討した。組織からの RNA 抽出ならびに定量的 RT-PCR は定法に従って行い、PCR には下記のプライマーを用いた。

α SMA-F: AGCGTGAGATTGTCCGTGACAT

α SMA-R: GCGTTCGTTTCCAATGGTGA

SM22 α -F: GTGTGGCTGAAGAATGGTGTGA

SM22 α -R: GCCACCTGTTCCATCTGCTTAA

TGF β -RII-F: AGCGGCCAGAAGTTTGTCTA

TGF β -RII-R: ATGGCCGAGGTTACAGACAC

EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で 72 時間培養し、内皮細胞由来の細胞を標識する蛍光タンパク質である tdTomato、間葉系細胞を標識する GFP、そして内皮細胞を標識する VEGFR2 に対する抗体で FACS ソーティングし、用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の作用を α SMA などの間葉系細胞のマーカーの発現を定量的 RT-PCR で測定することで検討した。

C. 研究結果

これまでの報告により、ナノマテリアルの吸入曝露により肺組織における炎症応答が起こり、線維化が誘導されることが明らかとなっている。そこで、今回の吸入曝露が線維化のマーカーである SM22 α ならびに α SMA の発現に与える影響を検討したところ、曝露開始後 3 日後までは対照群比較して有意な変化はなかったが、曝露 7 日後で両マーカーの発現がナノマテリアル吸入曝露により上昇することが示された(図 1)。また、肺胞上皮細胞の EMT を誘導することで線維化を誘導する TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現を検討したところ、曝露直後に上昇することが明らかとなった(図 1)。

肺の微小環境における TGF- β は肺胞上皮細胞の EMT を誘導するのみならず、血管やリンパ管内皮細胞の EndoMT を誘導することが報告されている。EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α SMA を発現する細胞 (EndoMT が誘導された細胞) が出現することを見出した。また、EndoMT が誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーである VEGFR2 の発現が維持されている細胞 (部分的 EndoMT が誘導されている細胞) と VEGFR2 発現が消失している細胞 (完全に EndoMT が誘導されている細胞) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分を FACS ソーティングし、EndoMT が段階的に進行していることを見出した(図 2)。

D. 考察

本分担研究では Prox1-GFP マウスに対して

ナノマテリアルの吸入曝露を行い、経時的に解剖を行った上で、組織免疫染色ならびに定量的 RT-PCR を行うためのサンプルを採取した。定量的 RT-PCR の結果からナノマテリアルの全身曝露により肺組織の線維化が誘導され、その原因として TGF- β シグナルが惹起されている可能性が推察された。ただ、実際に TGF- β シグナルが活性化されているかについては他のシグナル因子などの発現も検討する必要がある。また今後、線維化を誘導する要因として、炎症性シグナルが活性化されているか検討するために、IL-1 などの炎症性サイトカインの発現を検討することを計画している。

現在、病理組織標本を作製中であるが、ナノマテリアルの体内分布がどのように変化するかを検討する必要がある。さらに Prox1-GFP マウスを用いる利点を活かすために、今後の解析においては採取した肺組織を透明化処理して 3 次元で観察することも有用であると考えられる。

また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、EndoMT の段階的な進行を検出できることを見出した。今後、この実験系を用いて、部分的 EndoMT が誘導されている細胞において発現している EndoMT 誘導する制御因子を同定していくことを計画している。

E. 結論

ナノマテリアルの吸入曝露をリンパ管の可視化が可能な Prox1-GFP マウスに対して行い、肺組織において線維化が経時的に進行していることを確認した。今後、この実験系を用いて曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布するかを観察するとともに、

リンパ系の関与を検討する。また、EndoMT レポーター細胞を用いることにより、EndoMT 制御因子の同定を試みる。

F. 参考文献

Choi I, Chung HK, Ramu S, Lee HN, Kim KE, Lee S, Yoo J, Choi D, Lee YS, Aguilar B et al. (2011) Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood* 117, 362–365.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshimatsu Y, Watabe T. Emerging roles of inflammation-mediated endothelial-mesenchymal transition in health and disease. *Inflamm Regen*. 2022 Feb 7;42(1):9.

Ikami Y, Terasawa K, Sakamoto K, Ohtake K, Harada H, Watabe T, Yokoyama S, Hara-Yokoyama M. The two-domain architecture of LAMP2A regulates its interaction with Hsc70. *Exp Cell Res*. 2022 Feb 1;411(1):112986.

Inubushi T, Fujiwara A, Hirose T, Aoyama G, Uchihashi T, Yoshida N, Shiraishi Y, Usami Y, Kurosaka H, Toyosawa S, Tanaka S, Watabe T, Kogo M, Yamashiro T. Ras signaling and its effector RREB1 are required for the dissociation of MEE cells in palatogenesis. *Dis Model Mech*. 2022 Feb 1;15(2):dmm049093.

Asano Y, Okano D, Matsusaki M, Watabe T, Yoshimatsu Y, Akashi M, Shimoda H. Construction of transplantable artificial vascular tissue based on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by a cell coating and cryopreservation technique. *Sci Rep*. 2021 Sep 9;11(1):17989.

Kodama S, Podyma-Inoue KA, Uchihashi T,

Kurioka K, Takahashi H, Sugauchi A, Takahashi K, Inubushi T, Kogo M, Tanaka S, Watabe T. Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor- β isoforms with an Fc chimeric receptor. *Oncol Rep*. 2021 Sep;46(3):197.

Nishino K, Yoshimatsu Y, Muramatsu T, Sekimoto Y, Mitani K, Kobayashi E, Okamoto S, Ebana H, Okada Y, Kurihara M, Suzuki K, Inazawa J, Takahashi K, Watabe T, Seyama K. Isolation and characterisation of lymphatic endothelial cells from lung tissues affected by lymphangioliomyomatosis. *Sci Rep*. 2021 Apr 16;11(1):8406.

Terasawa K, Kato Y, Ikami Y, Sakamoto K, Ohtake K, Kusano S, Tomabechi Y, Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Guan JL, Kobayashi T, Iwata T, Watabe T, Yokoyama S, Hara-Yokoyama M. Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells. *Autophagy*. 2021 Apr 14:1-19.

2. 学会発表

Tetsuro Watabe. Roles of signaling and transcriptional networks during maintenance of vascular systems. 第44回日本分子生物学会 2021.12.02 Yokohama

Tetsuro Watabe. Roles of TGF- β family signals during progression of oral cancer.. 13th BMP Conference 2021.10.27 web

Yasuhiro Yoshimatsu, Kentaro Maeda, Naoya Takahashi, Ikumi Wakabayashi, Shiori Kimuro, Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Katarzyna A. Inoue, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe . Role of an ETS family transcription factor in endothelial mesenchymal transition (EndoMT)-driven EMT. 第80回日本癌学会学術総会 2021.10.01

Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Sakakitani Shintaro, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe. Activation of epithelial-mesenchymal transition program in oral cancer cells under TGF- β -induced cell cycle arrest. TGF- β Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (FASEB) 2021.07.20

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

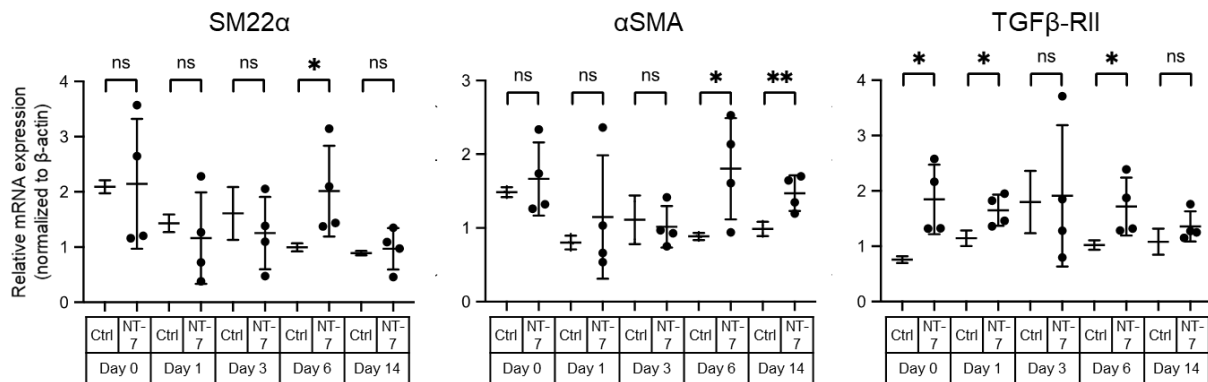


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺における遺伝子発現の変化の検討
 ナノマテリアル(NT-7)を吸入曝露(単回 6 時間)した Prox1-GFP マウスから曝露後 0 日・1 日・3 日・6 日・14 日後に肺組織をサンプリングし、定量的 RT-PCR を施行した。線維化のマーカーである SM22 α ならびに α SMA の発現と、線維化誘導シグナルとなる TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現がナノマテリアル吸入曝露により上昇することが明らかとなった。

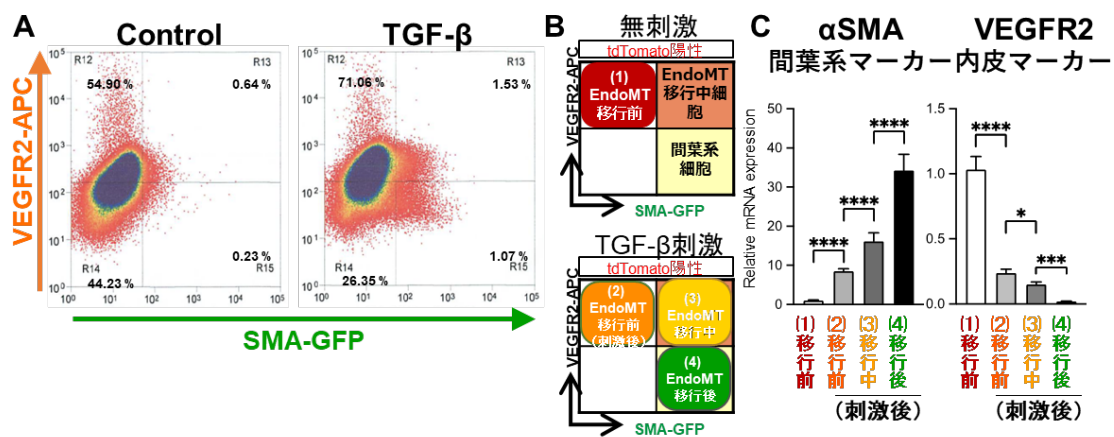


図2. EndoMT レポーター細胞を用いた EndoMT 遷移状態の同定

(A) EndoMT レポーター細胞を TGF- β 刺激すると VEGFR2 の発現が低下し、SMA-GFP の発現が上昇する EndoMT が多段階で誘導される細胞が観察される。(B, C) EndoMT の遷移状態を TGF- β 刺激した EndoMT レポーター細胞を FACS 分画することで解析した。EndoMT の進展とともに α SMA の発現が上昇し、VEGFR2 の発現が段階的に減少することが見出された。