

令和3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：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

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に関する研究

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	
	大塚 邦紘	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	
	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

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本年度の研究は、昨年度の長期曝露（24ヶ月）における免疫制御システムへの影響評価に加えて、新たなカーボンナノチューブであるNT-7の短期曝露実験を実施した。さらに、*in vitro*でのRAW264.7細胞を用いた実験系ならびにNF- κ B1遺伝子欠損マウスを用いたMWCNT-7による慢性腹膜炎モデルを用いた*in vivo*の実験を実施した。Taquan処理されたMWCNT-7の長期曝露によって肺胞マクロファージの活性化が継続していることがわかった。一方で、Taquan処理されたNT-7の短期吸入曝露によって、減少した肺胞マクロファージは曝露後4週で回復することが判明し、MMP-12あるいはCD54を介した肺胞マクロファージの活性化が短期試験においても確認された。また、MWCNT-7の直接の刺激に対してマクロファージからのMMP-12を介した線維芽細胞の活性化機構が存在し、マクロファージを起点としてNF- κ Bを介した活性化とMMP-12による線維化の制御機序が明らかになった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチュ

ーブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブ

の吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。一方で、ナノマテリアルの暴露による慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。また、一定期間のカーボンナノチューブの暴露後の長期観察により肺の線維化ならびに慢性炎症の持続が確認されているもの、長期間の全身暴露による免疫システムへの影響に関して不明な点が多い。本研究では、ナノマテリアルの長期暴露による免疫システムへの影響の評価系を確立することならびにナノマテリアル暴露による詳細な免疫反応に関して、マクロファージに焦点を当てて検討を進めた。

今年度はカーボンナノチューブ (MWCNT-7) の長期暴露による肺における免疫系への影響に関して、暴露から24ヶ月後の昨年度の報告できなかった点について解析を実施した。また、NT-7の短期暴露による肺免疫の変化について検討した。加えて、MWCNTの*in vitro* および*in vivo*での線維化の分子機構について検討を進めた。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

MWCNT 長期暴露実験：12 週齢の C57BL/6 (B6) (雄) を用い、各群 6 匹ずつで多層化カーボンナノチューブ

(MWCNT-7、三井) を全身吸入暴露装置 (Taquann 直噴全身吸入装置、Ver.3.0、国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、4 週毎断続的に暴露後 (24 ヶ月間) において適切に屠殺後解析を行った。

NT-7 短期暴露実験：12 週齢の C57BL/6 (B6) (雄) を用い、各群 5 匹ずつで NT-7 を全身吸入暴露装置 (Taquann 直噴全身吸入装置、Ver.3.0、国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、暴露後 0、7、14 および 28 日後において適切に屠殺後解析を行った。

・フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄液 (BALF) 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、遠心し、組織保存液 (MACS® Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec) に浸漬した。また、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。その後、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。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PerCP-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7, APC-Alexa Fluor 700) された各種表面マーカー CD3, CD19, CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD54,

CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色ならびに 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 処理、0.9%-formalin-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。頸部リンパ節に関しても、染色後固定した上で解析した。

・ *In vitro* 実験系

マウス単球細胞株 RAW264.7 を培養系に用いた。培養系で Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT)を 0~125 ng/ml の濃度で刺激した。細胞数、細胞の大きさ、MMP-12 mRNA の発現、線維芽細胞関連因子の mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した。

・ 定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞、肺組織、培養系の細胞からの RNA 抽出に関して通法に従い全 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。

MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; MARCO, forward, 5'-

AGAAAGGGAGACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; SRB1, forward, 5'-GGCTGCTGTTTGTCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; Cox2, forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCCTGGT-3' β -actin; forward, 5'-GTGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

・MWCNT の腹腔内投与実験:雄 B6 マウス(10 週齢)に腹腔内に 0、1、10 μ g(1 匹あたり)の Taquann 処理済みの MWCNT を投与し、6~12 ヶ月にて肝臓、脾臓、腹腔内滲出細胞を用いて病理学および免疫学的検討を実施した。さらに、NF- κ B1 遺伝子欠損マウスを用いて MWCNT の腹腔内投与実験を実施した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

MWCNT 長期暴露実験

2 年間の MWCNT の吸入暴露による肺および全身の免疫系について解析し報告した(R2 報告済み)。今年度は、BALF 細胞を用いた MWCNT の長期暴露による各種遺伝子発現の変動に関して解析した

(図 1)。MMP-12 mRNA 発現は MWCNT の暴露によって BALF 細胞ならびに肺組織において濃度依存的に有意に上昇した(図 2)。さらに、低濃度の MWCNT 暴露によって BALF 細胞における CD54 mRNA 発現の上昇が認められた(図 3)。また、MWCNT 暴露によって BALF 細胞における Cox2 mRNA 発現は有意に上昇した(図 4)。

NT-7 短期暴露実験

図 5 のような実験スケジュールで実施した。NT-7 暴露直後では、BALF 細胞の生細胞の割合は減少し、暴露 4 週では回復することがわかった(図 6)。BALF 細胞数は暴露後、1、2、4 週で対照群に比較して高くなっていた(図 7)。BALF 細胞のサイズに関しては、暴露後、2 週にて NT-7 暴露群で有意に低下していた(図 7)。

NT-7 暴露後の BALF 細胞中の肺胞マクロファージ (Alveolar macrophage:AM CD11c⁺CD11b⁻) に関して、2 週での高濃度暴露群で有意に減少していたが、その他の週で変化はなかった(図 8、9)。また、F4/80⁺ の未熟な単球を含めた割合に関しては、0 週と 2 週で NT-7 暴露によって割合が有意に上昇していることがわかった(図 9)。CD192 (M1 MΦ marker) および CD206 (M2 MΦ marker) によって分化パターンを検討すると、暴露後 2 週での低濃度 NT-7 暴露群で、対照群に比較して有意に M2 MΦ への分化が進んでいた(図 10)。

AM における CD54 および CD163 の発現について検討すると、暴露後 0 週、1 週および 2 週にて NT-7 暴露群で有意に発現が上昇していた(図 11)。なお、CD163

の発現に関して変化は認められなかった(図 11)。

肺組織における MMP-12 mRNA および CD54 mRNA の発現に関して、定量 RT-PCR にて検討すると、暴露後 0 週、1 週、4 週で MMP-12 mRNA の発現が有意に上昇していた(図 12)。CD54 mRNA 発現に関して変化は認められなかった(図 12)。なお、暴露後 2 週のサンプルに関しては、mRNA の採取ができなかった。

脾臓の細胞数、細胞のサイズに関しては、暴露による影響は確認されなかった(図 13)。一方、MΦ の M1/M2 分化を検討すると、CD206 陽性 MΦ の割合が暴露後 0 週で有意に低下していた(図 14)。

頸部のリンパ節の細胞数、細胞のサイズに関しては暴露による影響は認められなかった(図 15)。リンパ節における MΦ の分化パターンに関しては、暴露後 2 週での高濃度群で CD206 陽性細胞の割合が有意に減少していた(図 16)。

MWCNT の腹腔内投与実験

B6 マウスに Taquann 処理をした MWCNT (T-CNT) を腹腔内に投与後、10 ヶ月で線維化を伴う腹膜炎を発症することがわかり(図 17 A~G)、その発症機序に NF-κB を介した MMP-12 の関与が NF-κB 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、明らかになった(図 18 A~D)。

さらに、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験で、T-CNT の添加によって直接 MMP-12 mRNA 発現が上昇することが明らかになった(図 19 A~E)。

E. 結論

MWCNT-7の全身吸入の長期暴露(24ヶ月)後のBALF細胞中の肺胞マクロファージの割合が増加するとともに、脾臓あるいはリンパ節など全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。

NT-7の全身吸入による短期暴露実験では、暴露後のBALF細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。NT-7吸入暴露によってBALF中の単球および未分化マクロファージが増加することがわかった。また、NT-7吸入暴露によって、肺胞マクロファージはM2マクロファージへの分化が認められた。NT-7吸入暴露によって、CD54陽性肺胞マクロファージが増加した。加えて、肺組織におけるMMP-12 mRNA発現が増加した。NT-7吸入暴露によって、脾臓、頸部リンパ節での免疫担当細胞の分画へは大きな影響はなかったが、M2型マクロファージの肺への動員の可能性が考えられた。

F. 研究発表

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. S1074-7613(22)00136-4.
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. 19:1-14
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.
3. 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.
4. 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.
5. 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/Cyp1a1 signaling axis. *Sci Rep*. 2021, 11(1): 14927
6. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation of

- Autoimmune Lesions is Independent of Antibiotic Treatment in NOD mice. *Int J Mol Sci.* 2021, 22,3239.
7. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M, Awasthi P, Takada T, Takahama Y. Thymoproteasome hardwires TCR repertoire of CD8+ T cells with cortical positive selection independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904.
 8. Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakakai R, Ishimaru N, Matsushita K. Chemokines upregulated in epithelial cells control senescence-associated T cell accumulation in salivary glands of aged and Sjögren's syndrome model mice. *Int J Mol Sci.* 2021, 22:2302.
- ## 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 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)
 8. 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)

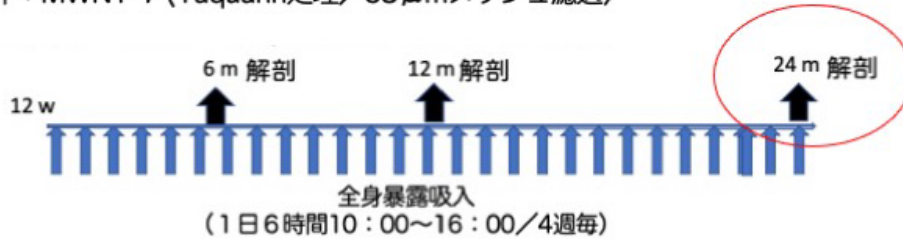
9. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA sequencing reveals accumulation of CD4 and CD8 T cells with unique phenotypes in salivary glands of Sjögren's syndrome model mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
(2020.9)

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 (出願中)
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

マウス：C57BL/6NcrSLC ♂
暴露検体：MWNT-7 (Taquann処理/53μmメッシュ濾過)

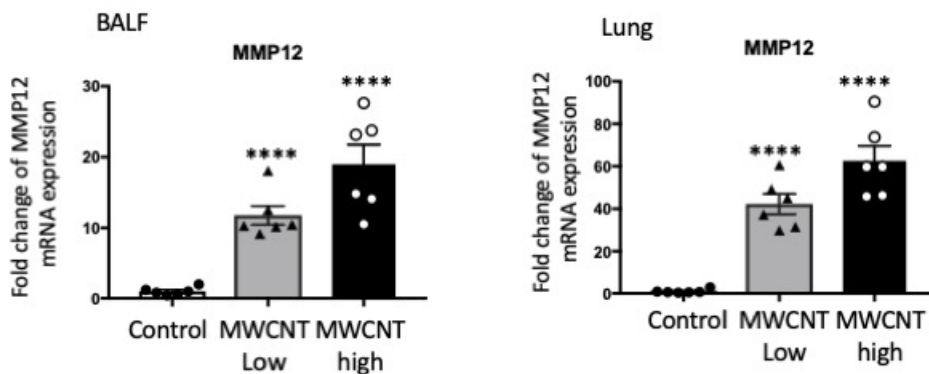


対照群 (清浄空気)
T-CNT7 低濃度群 (3 mg/m³)
T-CNT7 高濃度群 (6 mg/m³)

免疫機能解析 (各群6匹)
(1) BALF細胞FCM解析
(2) BALF細胞遺伝子解析 (qRT-PCR)
(3) BALFサイトカイン (Multiplex)
(4) 肺組織遺伝子解析 (qRT-PCR)
(5) 脾臓、リンパ節FCM解析

図2

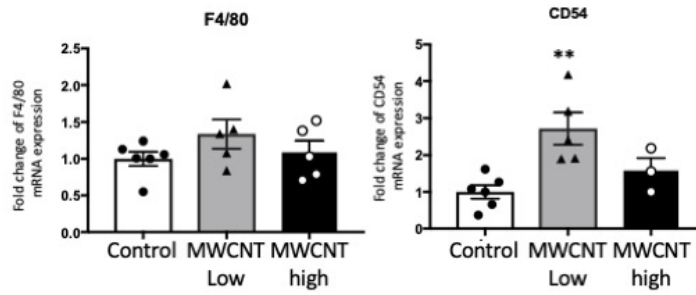
Enhanced MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung in MWCNT-7-exposed for 24 months



*p<0.01
****p<0.00001

图3

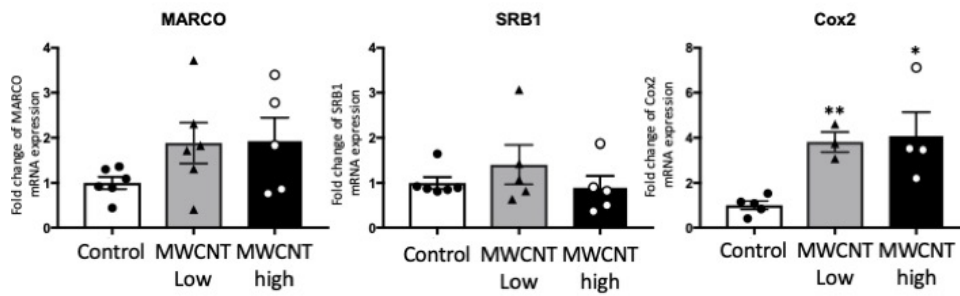
F4/80 and CD54/ICAM1 mRNA expression of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice for 24 months



**p<0.01

图4

Scavenger receptors and Cox2 mRNA expression of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice for 24 months

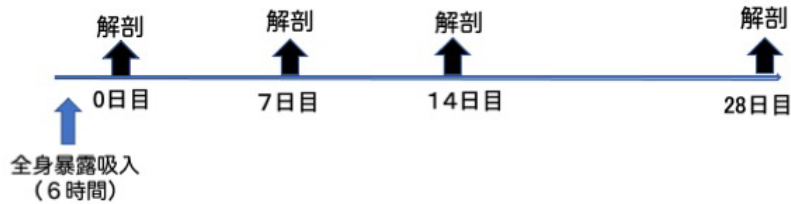


*p<0.05
**p<0.01

図5

Experimental protocol

マウス：C57BL/6NcrSLC ♂
暴露検体：NT-7 (Taquann処理)

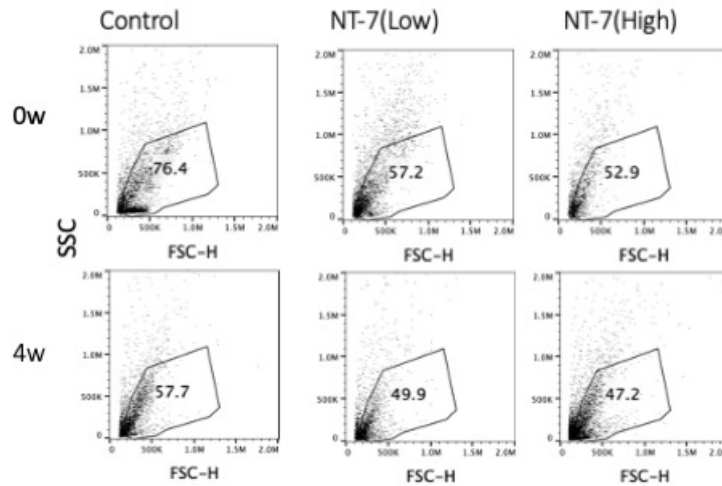


対照群 (清浄空気)
NT-7 低濃度群
NT-7 高濃度群

免疫機能解析 (各群5~6匹)
(1) BALF細胞FCM解析
(2) BALF細胞遺伝子解析 (qRT-PCR)
(3) BALFサイトカイン (Multiplex)
(4) 肺組織遺伝子解析 (qRT-PCR)
(5) 脾臓、リンパ節FCM解析

図6

Effect of NT-7 exposure on BALF cells



暴露直後はBALF細胞 (生細胞) は減少する。
暴露後4週では回復。

図7 Effect of NT-7 exposure on BALF cells

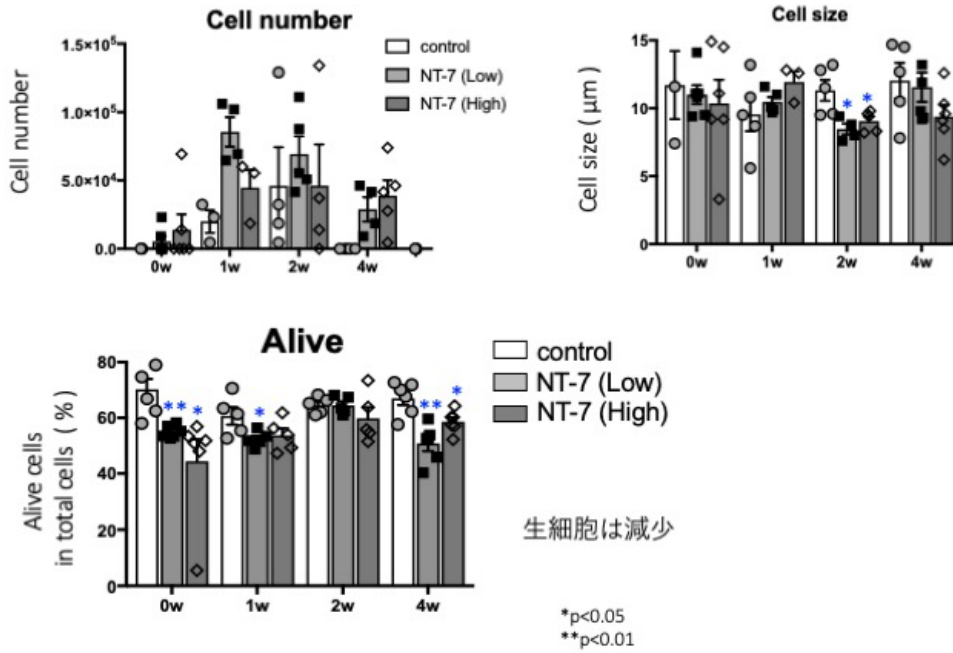


図8 Effect of NT-7 exposure on alveolar macrophages

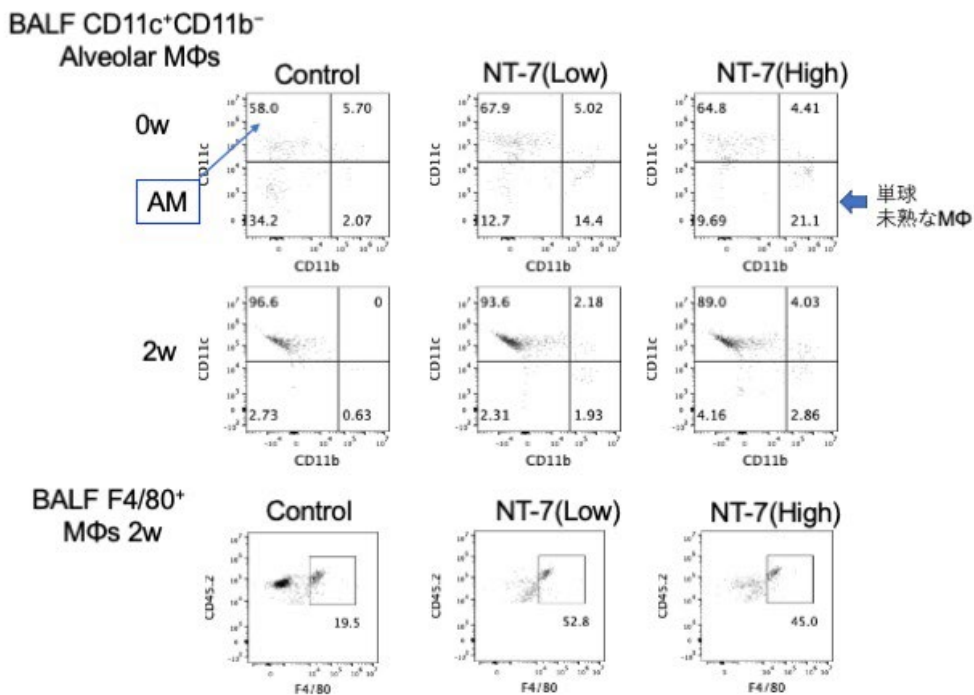
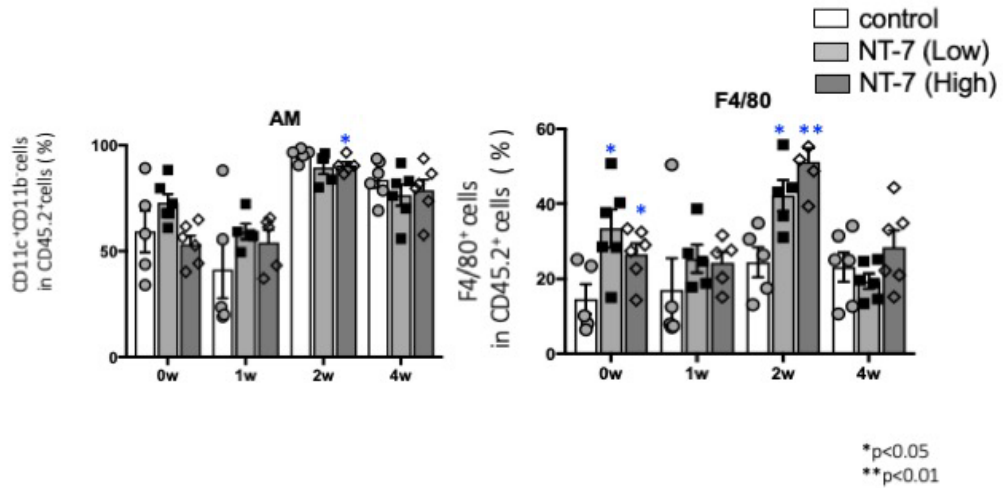


図9

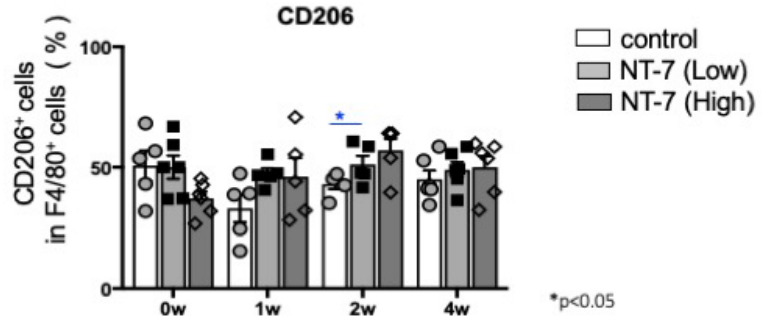
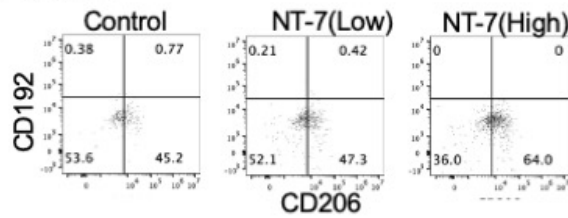
Effect of NT-7 exposure on alveolar macrophages



暴露後に未熟な単球あるいはマクロファージが増加する

図10 Differentiation into M2 macrophage by NT-7 exposure

BALF CD206⁺ MΦs 2w



暴露後2週間でM2 MΦへのシフト

図11 CD54 expression on alveolar macrophages in BALF cells

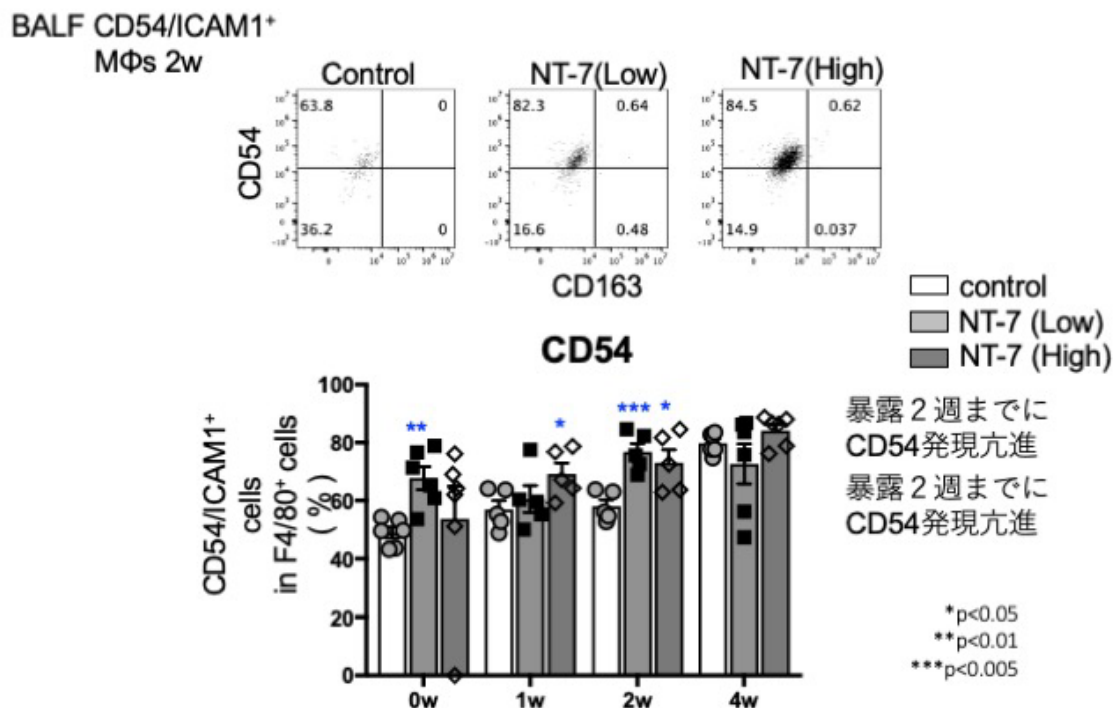


図12 MMP12 and CD54 mRNA expression of lung tissues from NT-7-exposure mice

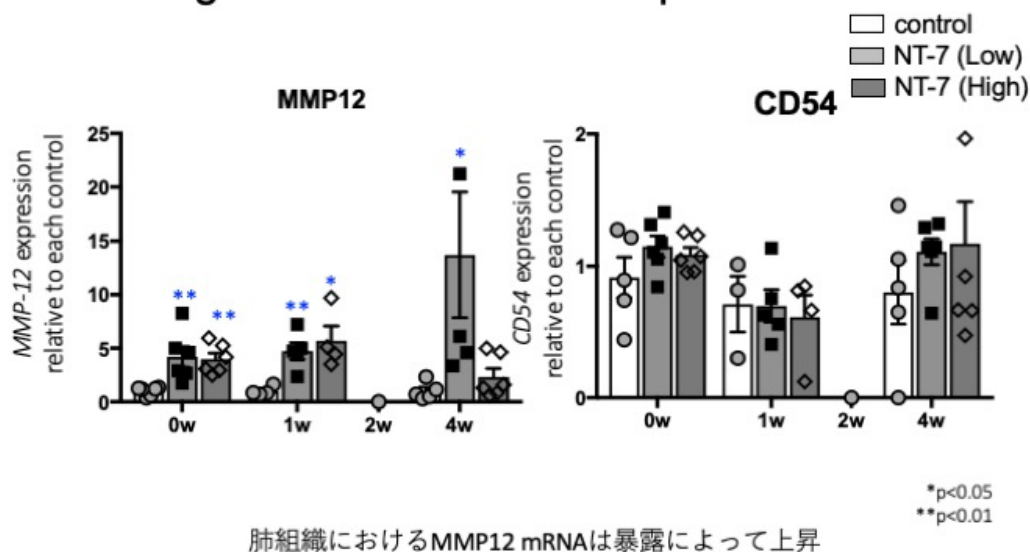


図 13

Effect of NT-7 exposure on spleen cells

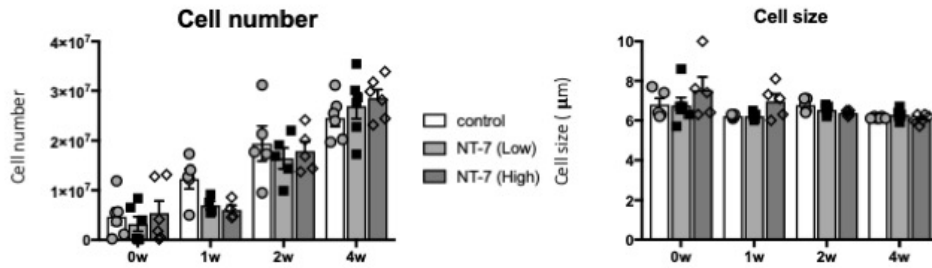
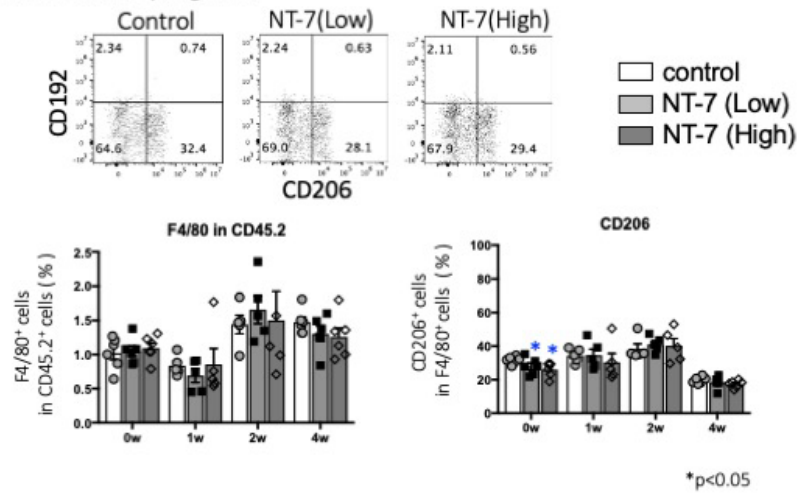


図 14

Effect of NT-7 exposure on spleen macrophages

Sp CD206⁺ macrophages 0w



暴露直後にM2Φの肺への動員?
AMΦではM2へシフト

Figure 15

Effect of NT-7 exposure on lymph node cells

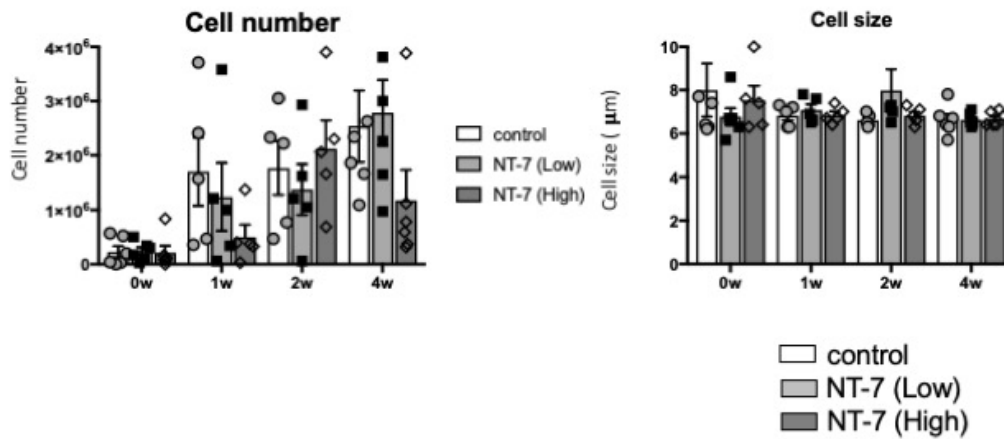
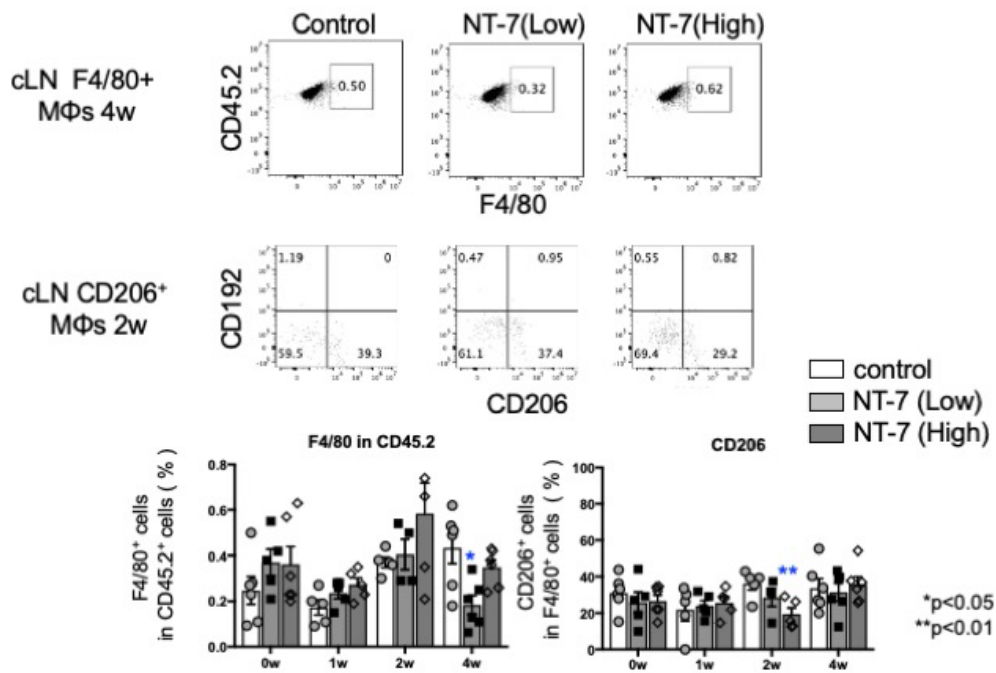


Figure 16 Effect of NT-7 exposure on lymph node cells



Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis

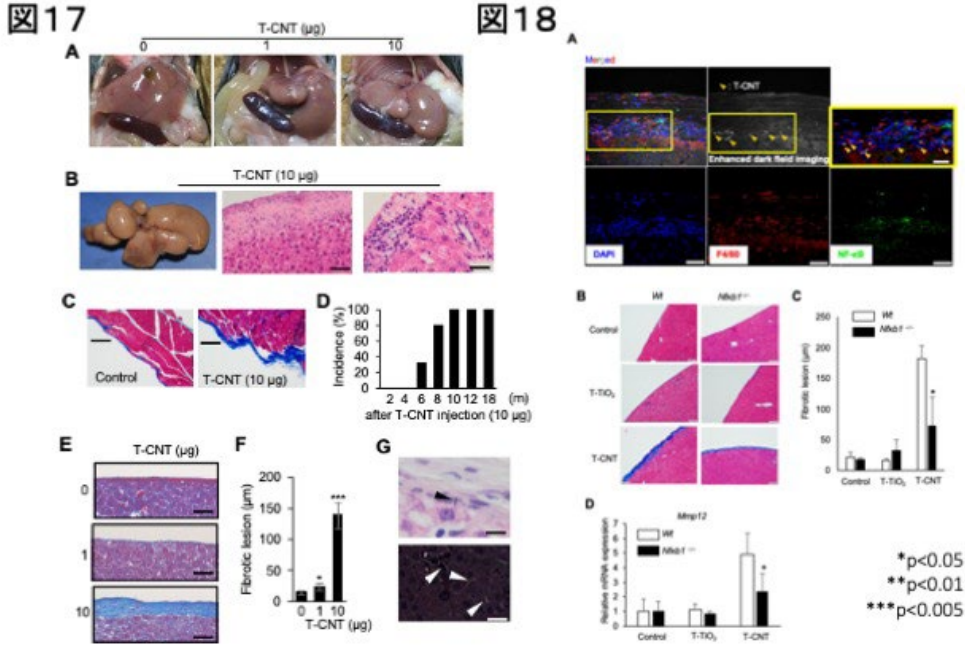


Figure 19 *In vitro* culture of macrophages with T-CNTs

