

令和4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

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、気管支の分岐部分において NT-7 と考えられる粒子が集積し、曝露量依存的に粒子の集積が増加することが観察された。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 存在下で培養して、EndoMT が誘導された細胞から FACS ソーティングによって分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞 (間葉系細胞マーカーである SMA の発現が上昇しているが、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) における特異的マーカー候補を同定した。この候補の発現は TGF- β により上昇し、EndoMT が進行するとともに低下しており、ナノマテリアルの吸入曝露による EndoMT の進行を抑制するための標的となることが期待される。

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、肺胞上皮細胞の内皮間葉移行 (EndoMT) 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、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った。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: 1 頭)、低濃度曝露群 (Low concentration 群: 3 頭)、高濃度曝露群 (High concentration 群: 3 頭) の 3 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 13 回行った。

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は透明化用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布を観察するために、定法に従って肺組織の透明化を行い、3 次元レベルの観察を Leica THUNDER モデル生物実体顕微鏡を用いて施行した。

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、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。定量的 RT-PCR は定法に従って行い、PCR には下記ライマーを用いた。

VEGFR2-F: AGCGTGAGATTGTCCGTGACAT
VEGFR2-R: GCGTTCGTTTCCAATGGTGA
SM22 α -F: GTGTGGCTGAAGAATGGTGTGA
SM22 α -R: GCCACCTGTTCCATCTGCTTAA
FACS 分画した細胞集団における遺伝

子発現を網羅的に解析するために、RNA sequencing を定法に従って施行し、TGF- β 刺激によって発現が上昇し、EndoMT が進行するとともにその発現が低下する細胞膜に分布する因子を探索した。

C. 研究結果

低濃度ならびに高濃度のナノマテリアル (NT-7) を吸入曝露した Prox1-GFP マウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡によって観察したところ、ナノマテリアルの吸入量依存的に気管が黒ずんでいることが観察された (図 1)。

さらに、透明化した肺における GFP で標識されたリンパ管を蛍光顕微鏡で観察した。NT-7 を吸入曝露していない群では規則正しい構造の毛細リンパ管が観察されたのに対して、高濃度で曝露した群ではその構造が観察されなかった (図 2)。

また、明視野での観察により、ナノマテリアルと考えられる黒い物質が粒状に特に気管支の分岐部分に観察された (図 2)。また、蓄積物はリンパ管付近に分布している可能性が示唆された。

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。EndoMT 誘導の分子機構を明らかにするために、昨年度までに樹立した EndoMT レポーター細胞 (EMREC) を用いて、EndoMT の遷移状態を解析した。TGF- β 刺激した EMREC を VEGFR2 (内皮細胞マーカー) と SMA-GFP (間葉系細胞マーカー) の発現を指標に FACS 分画した。TGF- β 無処理の細胞における VEGFR2 陽性 (+):SMA-GFP 陰性 (-)

の細胞画分を「内皮細胞 (EC)」とした。また、TGF- β 存在下で 72 時間培養した EMREC における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「TGF- β 処理した内皮細胞 (T β -EC)」、VEGFR2+:SMA-GFP+ の細胞画分を「Partial EndoMT (Partial)」、VEGFR2-:SMA-GFP+ の細胞画分を「Full EndoMT (Full)」として遺伝子発現解析を施行した (図 3A)。その結果、EndoMT の進展 (EC \Rightarrow T β -EC \Rightarrow Partial \Rightarrow Full) とともに段階的に VEGFR2 の発現が減少し (B)、 α SMA の発現が上昇する (C) ことが見出された。

Partial EndoMT においては、EndoMT の誘導のために重要な様々な細胞変化が起こっており、Partial EndoMT を誘導する分子的機構を解明することは必要な意義を持つが、その特異的なマーカーが同定されていなかったため、その解析は困難であった。今回 EC と比較して、T β -EC と Partial において発現が上昇して Full で低下する候補因子を RNA sequencing の結果を解析して同定した。Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現は T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが mRNA (図 3D) とタンパク質 (図 3E) レベルで明らかとなった。

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、採取した肺組織を透明化処理して 3 次元で観察した。得られた結果からナノマテリアルの全身曝露によりナノマテリアルが気管そしてリンパ管の近傍に集積している可能性が推察された。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経時的に肺のサンプルを回収して検討する必要がある。

また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、Partial EndoMT 特異マーカーの候補を同定した。今後、この実験系を用いて、今回得られた候補因子の EndoMT の誘導における作用を解析することで、EndoMT を制御する分子機序を解明する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

Takahashi K, Podyma-Inoue KA, Saito M, Sakakitani S, Sugauchi S, Iida K, Iwabuchi S, Koinuma D, Kurioka K, Konishi T, Tanaka S, Kaida A, Miura M, Hashimoto S, Okada M, Uchihashi T, Miyazono K, *Watabe T. TGF- β generates a population of cancer cells

residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via keratin-associated protein 2-3. *Cell Reports*. 2022, 40(13):111411.

Takahashi K, Abe K, Kubota SI, Fukatsu N, Morishita Y, Yoshimatsu Y, Hirakawa S, Kubota Y, Watabe T, Ehata S, Ueda HR, Shimamura T, Miyazono K. A new analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis. *Nat Commun*. 2022, 13(1):5239

Kobayashi M, Fujiwara K, Takahashi K, Yoshioka Y, Ochiya T, *Podyma-Inoue KA, *Watabe T. Transforming growth factor- β -induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition. *Inflammation and Regeneration*. 2022, 42(1):38.

Nakayama K, Nishijo T, Miyazawa M, Watabe T, Azuma M, Sakaguchi H. Hapten sensitization to vaginal mucosa induces less recruitment of dendritic cells accompanying TGF- β -expressing CD206 + cells compared with skin. *Immun Inflamm Dis*. 2022, 10(4):e605.

2. 学会発表

健康の維持における血管とリンパ管の役割, 渡部徹郎, Tie2・リンパ・血管研究会ミニセッション, 2022/05/19, 国内, 口頭.

内皮間葉移行(EndoMT)レポーター内皮細胞を用いた EndoMT の可視化とがん細胞の脈管内侵入機序の解明, 高橋和樹, 勝又寿枝, 小林美穂, 池田行徳, 篠原満利恵,

前田健太郎, 吉松康裕, 松永行子, 渡部徹郎, 第 46 回日本リンパ学会総会, 2022/06/04, 国内, 口頭.

口腔がん細胞由来エクソソームによる内皮不安定化機構, 小林美穂, 藤原花汐, 高橋和樹, 井上カタジナアナ, 渡部徹郎, 第 46 回日本リンパ学会総会, 2022/06/04, 国内, 口頭.

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 Relationship between age-dependent vascular endothelial cell decline and stress responsiveness, Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe, The 22nd International Vascular Biology Meeting (IVBM2022), 2022/10/14, 国外, 口頭.

Roles of TGF- β signals during formation and maintenance of vascular systems, Tetsuro Watabe, The 22nd International Vascular Biology Meeting (IVBM2022), 2022/10/16, 国外, 口頭. 27. Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies, Tetsuro Watabe, KVBM2022, 2022/11/25, 国外, 口頭.

脈管の恒常性維持と加齢との関係, 小林美穂, 高橋和樹, 勝又寿枝, 廣瀬穂香, 吉松康

裕, 中山雅敬, 松永行子, 渡部徹郎, 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022/12/02, 国内, ポスター.

内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター内皮細胞を用いた EndoMT 遷移段階の検出, 勝又寿枝, 高橋和樹, 小林美穂, 前田健太郎, 吉松康裕, 松永行子, 渡部徹郎, 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022/12/03, 国内, ポスター.

加齢に伴う血管内皮細胞の減少とストレス応答性の関係, 小林美穂, 廣瀬穂香, 中山雅敬, 渡部徹郎, 第 30 回日本血管生物医学学会 学術集会 (CVMW2022), 2022/12/16, 国内, 口頭.

脈管の恒常性維持と破綻における負のアンジオクラインシグナルの役割, 渡部徹郎, 第 30 回日本血管生物医学学会 学術集会 (CVMW2022), 2022/12/17, 国内, 口頭.

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
3. その他
なし

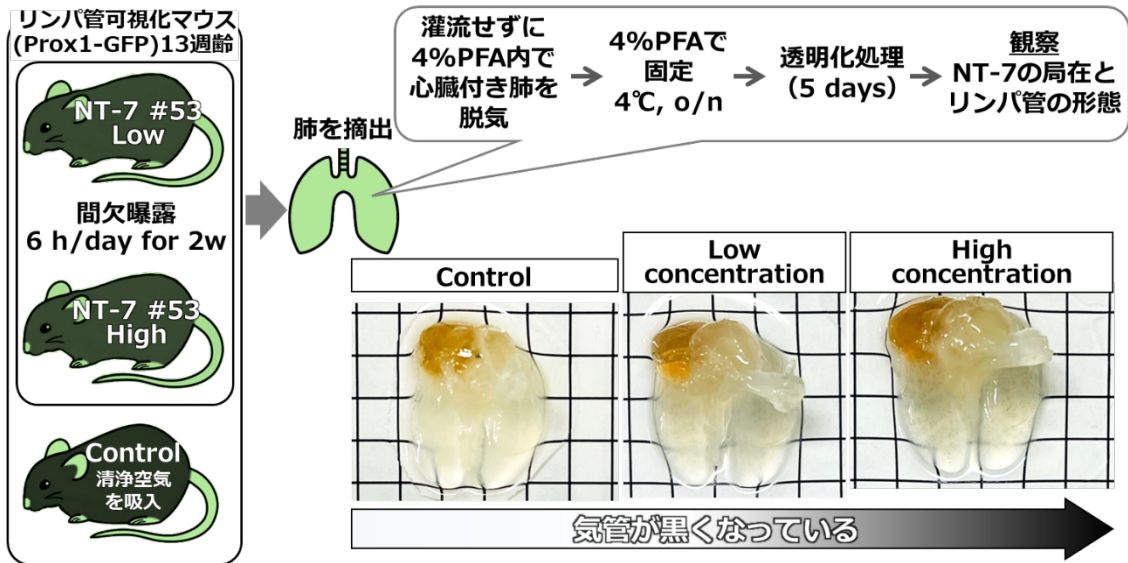


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺の透明化

低濃度ならびに高濃度のナノマテリアル (NT-7) を吸入曝露 (1 回 6 時間、2 週間) した Prox1-GFP マウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行った。実体顕微鏡によって観察したところ、ナノマテリアルの吸入量依存的に気管が黒ずんでいることが観察された。

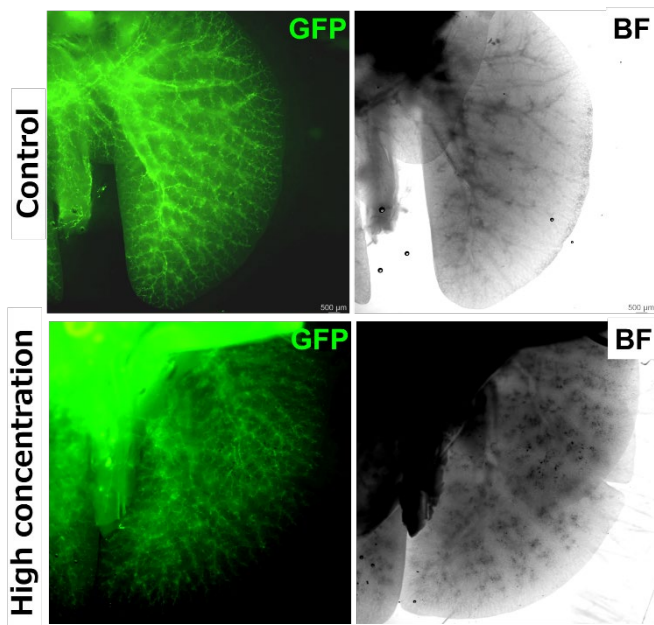


図2. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

透明化した肺を蛍光 (GFP) ならびに明視野 (Bright field: BF) で顕微鏡観察した。NT-7 を吸入曝露していない群 (上段) では規則正しい構造の毛細リンパ管 (GFP で標識) が観察されたのに対して、高濃度で曝露した群 (下段) ではその構造が観察されなかった。また、明視野での観察により、ナノマテリアルと考えられる黒い物質が粒状に特に気管支の分岐部分に観察された。

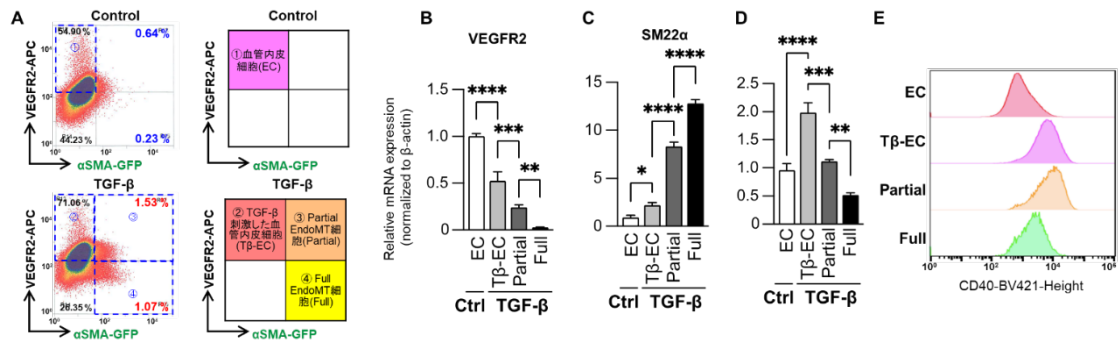


図 3. EndoMT レポーター細胞を用いた Partial EndoMT 特異マーカーの同定

(A) EndoMT の遷移状態を TGF- β 刺激した EndoMT レポーター細胞を VEGFR2 (内皮細胞マーカー) と SMA-GFP (間葉系細胞マーカー) の発現を指標に FACS 分画することで解析した。TGF- β 無処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「内皮細胞 (EC)」とし、TGF- β 処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「TGF- β 処理した内皮細胞 (T β -EC)」、VEGFR2+:SMA-GFP+ の細胞画分を「Partial EndoMT (Partial)」、VEGFR2-:SMA-GFP+ の細胞画分を「Full EndoMT (Full)」として遺伝子発現解析を施行した。(B, C) EndoMT の進展とともに段階的 VEGFR2 の発現が減少し(B)、 α SMA の発現が上昇する(C)ことが見出された。(D, E) Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現が T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが mRNA (D) とタンパク質 (FACS 解析の定量化: E) レベルで明らかとなった。