

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のため研究

令和5年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージの免疫学的解析

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	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	牛尾 綾	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5年度の本分担研究では、マウス骨髄由来マクロファージを用いて、ナノシリカ (NM202 および NM204) に対する *in vitro* での反応性を詳細に検討した。また、多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) による MMP-12 を介したマクロファージの活性化機構についても検討を加えた。ナノシリカ (NM202, NM204) とカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性は異なっており、カーボンナノチューブに対しては従来の報告通り MMP-12 を介した反応性が観察されたが、ナノシリカでは MMP-12 の発現に変動は見られなかった。ナノシリカに対しては IL-1 β の mRNA 発現上昇が認められた。MWCNT とナノシリカに対するマクロファージの反応性は大きく異なっている可能性が示された。以上のことから、NM の形状・性状によってマクロファージの反応性は異なっており、NM の認識、貪食のプロセスに伴う NM 関連分子の発現パターンが NM の種類によって多様性がある可能性が示された。

A. 研究目的

R5年度の本研究では、ナノシリカに対するマクロファージの貪食、活性化機構に関して、詳細な分子機序の解明を目指すとともに、*in vitro* におけるナノシリカとカーボンナノチューブなどの他のナノマテリアルとの反応性の違いを *in vitro* で検証することを目的とした。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

マウス骨髄由来マクロファージを用いて、Taquann 処理を施したナノシリカ (NM202 および NM204) に対する炎症反応を検討する

とともに、多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) による MMP-12 を介したマクロファージの活性化機構について検討した。

雄マウス (C57BL/6、7 週齢) の大腿骨より骨髓細胞を採取し、リコンビナント M-CFS (100 ng/mL) 添加培地にて 7 日間培養することで成熟マクロファージに分化させた。NM202、NM204 (250 ng/ml~1000 ng/ml) および T-CNT (MWCNT) (167 ng/ml) を培養系に用いた。また、MMP-12 特異的阻害剤 MMP408 (12.5, 25, 50, 100 nM; Calbiochem) を T-CNT とともに用いた。培養したマクロファージから mRNA を抽出し、cDNA 合成後定量 RT-PCR により遺伝子発現を評価した。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', *Icam1*; (f) 5'-AACYGYGGCACCGTGCAGTC-3', (r) 5'-AGGGTGAGGTCCTTGCTACTTG-3', *Tim4*; (f) 5'-GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3', *Il1b*, (f) 5'-CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG-3', (r) 5'-CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG-3', *Tnfa*, (f) 5'-CACAGAAAGCATGATCCGCGACGT-3', (r) 5'-CGGCAGAGAGGAGGTTGACTTTCT-3', *Ifng*, (f) 5'-TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG-3', (r) 5'-TGCAGGATTTTCATGTCCACCAT-3', *Sma*, (f) 5'-GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA-3', (r) 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3', *Fnl*, (f) 5'-CGAGGTGACAGAGACCACAA-3', (r) 5'-CTGGAGTCAAGCCAGACAC-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

マウス骨髓由来マクロファージを用いて (図 1)、NM202 (250, 500, 1000 ng/ml)、NM204 (250, 500, 1000 ng/ml) および T-CNT (167 ng/ml) を添加し、24 時間培養後における細胞の生存率を確認したところ、対照群と変化は認められなかった (図 2)。また、*Mmp12* mRNA 発現に関しては、T-CNT 添加で対照に比較して 1.7 倍上昇していたが、NM202 および NM204 の添加では変化が認められなかった (図 3)。また、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現に関しては、T-CNT、NM202 および NM204 の添加で変化は観察されなかった (図 3)。さらに、*Il1 β* 、*TNFA*、*Ifng* mRNA 発現を検討すると、*Il1 β* mRNA 発現が NM202 あるいは NM204 の添加で上昇していたが、T-CNT 添加では変化が見られなかった (図 4)。TNF- α ならびに *Ifn* mRNA 発現に関しては、いずれの NM 添加でも変動は観察されなかった (図 4)。

NM に対するマクロファージの反応性における MMP-12 の役割を理解するために、MMP-12 阻害剤 (MMP408) を用いた検討を進めた。T-CNT に対する反応性を検討すると、T-CNT の反応によって上昇した *Mmp12* mRNA 発現は MMP408 の添加によって変動はなかった (図 5)。また、*Icam1* mRNA、*Tim4*

mRNA、*Il1b* mRNA、*Tnfa* mRNA、*Ifng* mRNA 発現ともに T-CNT による発現と変化は認められなかった (図 5)。

ナノマテリアルがマクロファージの線維芽細胞様変化 (マクロファージ-筋線維芽細胞移行 : macrophage-to-myofibroblast transition: MMT) を起こす可能性を想定して T-CNT および NM202 の培養系で pro-fibrotic marker である Smooth muscle action (*Sma*) ならびに Fibronectin1 (*Fnl*) mRNA 発現を検討すると、*Sma* mRNA 発現に関しては、T-CNT で対照に比較して軽度上昇する一方で、NM202 の反応では、逆に低下する傾向が確認された (図 6)。*Fnl* mRNA 発現に関しては T-CNT では上昇は見られず、NM202 では軽度上昇傾向が認められた (図 6)。

D. 考察

ナノシリカ (NM202, NM204) とカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性は異なっており、カーボンナノチューブに対しては従来の報告通り MMP-12 を介した反応性が観察されたが、ナノシリカでは MMP-12 の発現に変動は見られなかった。ナノシリカに対しては *Il1b* の mRNA 発現上昇が認められた。

MMP-12 の阻害剤である MMP408 を用いた実験では *Mmp12* mRNA の発現には変動はなく、遺伝子レベルでの発現に影響を及ぼさないものと考えられた。今後、MMP-12 活性に基づいたタンパクレベルでの種々の変化を検討する必要がある。また、*Tim4* ならびに *Il1b* mRNA が MMP408 の添加で変動していたが、有意な変化ではなかった。

MMT に関しては、網膜下の線維化において組織常在型マクロファージが MMP12 の作用により筋線維芽細胞様の細胞に移行す

ることが報告されており (*J Neuroinflammation* 2022)、その詳細な分子機序は不明のままである。T-CNT の吸入暴露により、肺胞マクロファージが MMP12 を強く産生し、肺の間質での線維化に関与していることが明らかになっていることから (*PLoS One* 2018)、ナノマテリアルに対するマクロファージの反応性が MMT を介している可能性が考えられる。T-CNT の添加によって *Sma* mRNA の発現が上昇していたので、T-CNT に対する反応性は MMT に関連している可能性は否定できない。一方で、NM202 での反応性は MMT とは結びつかない可能性も考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの形状・性状によってマクロファージの反応性は異なっており、ナノマテリアルの認識、貪食のプロセスに伴うナノマテリアル関連分子の発現パターンがナノマテリアルの種類によって多様性がある可能性がある。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

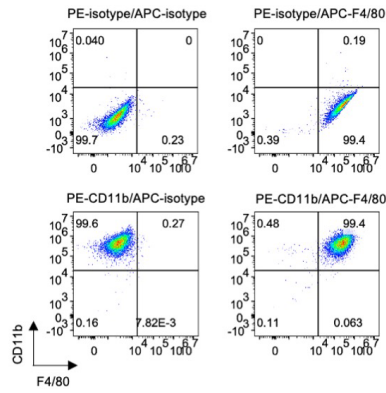
1. Tawara H, Tsunematsu T, Kitajima S, Nagao R, Matsuzawa S, Otsuka K, Ushio A, Ishimaru N. The non-canonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 706:149741, 2024.
2. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D. Continuous infiltration of small peritoneal

- macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci.* 12:617-639, 2023.
3. Jin S, Tsunematsu T, Horiguchi T, Mouri Y, Shao W, Miyoshi K, Mizusawa N, Hagita H, Sarubo M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Kitajima S, Ozaki K, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Involvement of the PTUB1-YAP1 axis in driving malignant behaviors in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12:22156-22169, 2023.
 4. Sugimoto A, Iwata K, Kurogoshi R, Tanaka M, Nakashima Y, Yamakawa Y, Oishi A, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwamoto T. C-terminus of PIRZO1 governs Ca²⁺ influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 682:39-45, 2023.
 5. Ishimaru N, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. *Annals of Work Exposures and Health* 67(Supplement 1) i74, 2023.
 6. Sato-Fukuba M, Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N*. CD4⁺ T-cell-dependent differentiation of CD23⁺ follicular B cells contributes to the pulmonary pathology in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Front Immunol.* 14:1217492, 2023.
 7. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoshi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T. Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 650:47-54, 2023.
 8. Shao W, Tsunematsu T, Umeda M, Tawara H, Fujiwara N, Mouri Y, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Cancer cell-derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12:8510-8525, 2023.
 9. 石丸直澄:シェーグレン症候群疾患モデルからのトランスレーショナル研究 炎症と免疫 31(3):35-39, 2023.
 10. 石丸直澄:臓器間ネットワークと自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 80(3):311-316, 2023.
- F.2 学会発表
1. Naozumi Ishimaru. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference 2023 Invitation Lecture, 2023.5.15, Manchester, UK.
 2. Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
- G. 知的財産権の出願・登録状況
無し（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

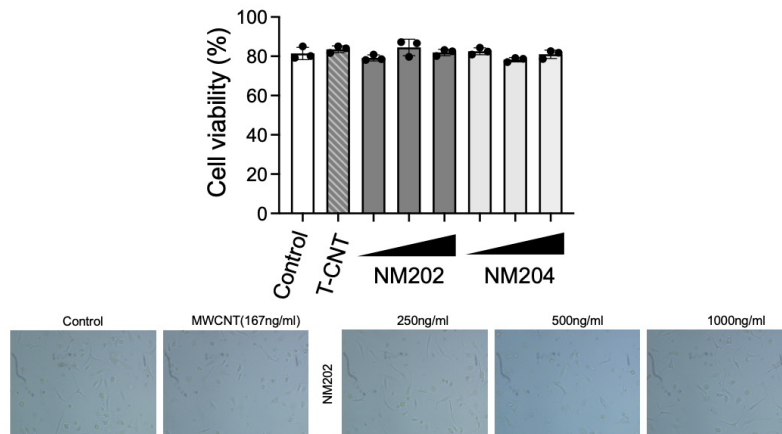
☒ 1

Bone marrow-derived macrophages



Bone marrow cells were collected from femurs and tibiae of male C57BL/6J mice (7w). Obtained whole BM cells were cultured in petri dishes with RPMI-1640 containing 10% FBS, 20 mM HEPES, 1 mM non-essential amino acids and recombinant M-CSF (100 ng/mL) for 7 days. Attached cells were used as bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

☒ 2



(NM202: 250, 500, 1000 ng/mL NM204: 250, 500, 1000 ng/mL)

图 3

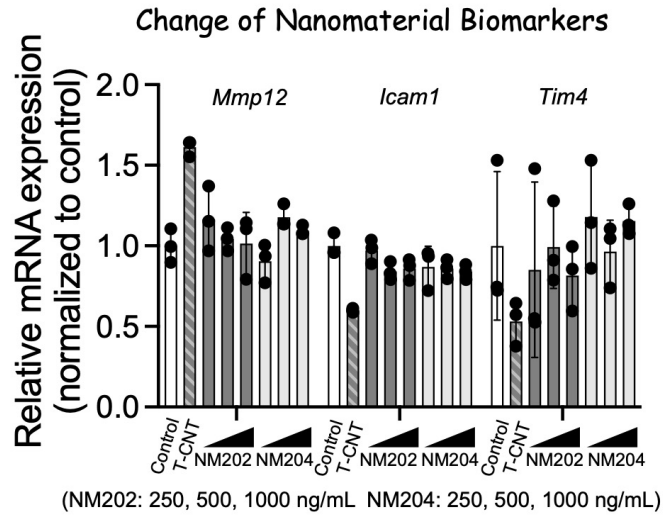


图 4

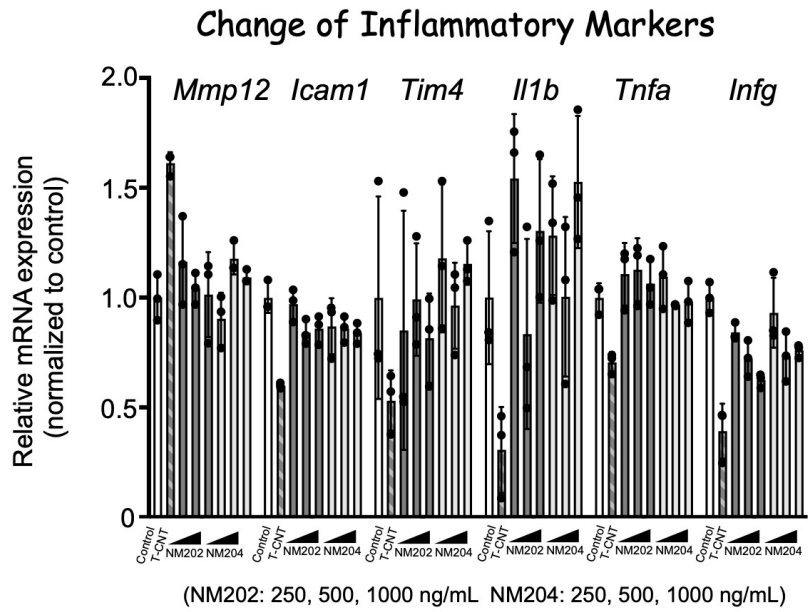
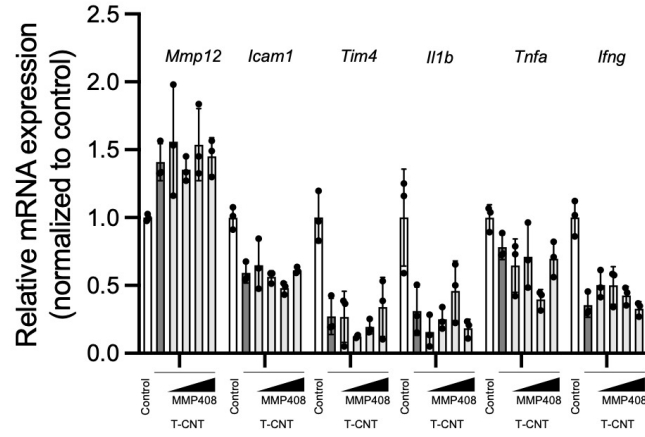


Figure 5

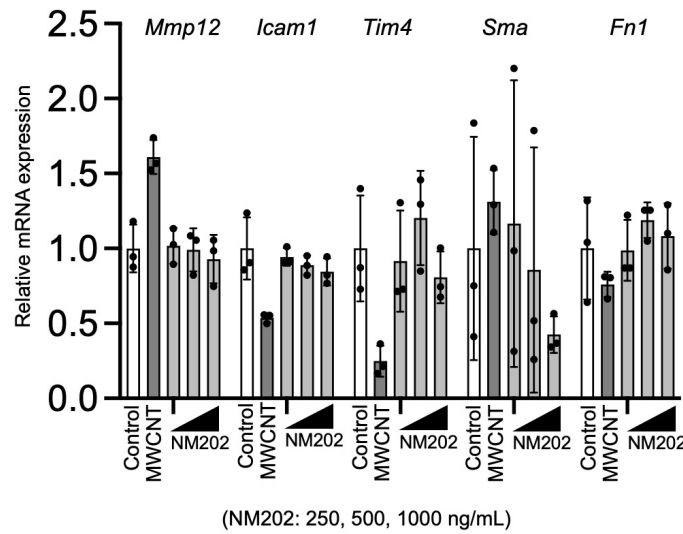
Effect of MMP12 inhibitor (MMP408) on mRNA expression of nanomaterial biomarkers



MMP408: MMP12 Specific inhibitor (12.5, 25, 50, 100 nM) T-CNT: 250 ng/mL

Figure 6

Pro-fibrotic markers of BMDMs stimulated with NM202



(NM202: 250, 500, 1000 ng/mL)