

令和5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。今回 3 週間にわたり NT-7 の吸入曝露を行った Prox1-GFP マウスの肺を透明化し、ライトシート顕微鏡を用いてリンパ管の構造を 3 次元で解析したところ、NT-7 の吸入曝露により、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。今後 NT-7 の吸入曝露を行った肺組織における遺伝子発現解析を進める予定である。

肺の微小環境における TGF- $\beta$  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 TGF- $\beta$  存在下で培養して EndoMT が誘導された EndoMT レポーター細胞から分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカーとして CD40 を同定した。CD40 の発現を siRNA で低下させることで TGF- $\beta$  による EndoMT の誘導が亢進されたことから、CD40 は部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していることが示唆された。以上の結果から CD40 は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。

## 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- $\beta$  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。Taqaunn 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 3 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- $\beta$  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、TGF- $\beta$  の作用を  $\alpha$ 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 は定法に従って行った。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- $\beta$  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)。さらにこれらの肺におけるリンパ管の構造をライトシート顕微鏡で観察したところ、NT-7 の吸入曝露によるリンパ管の構造の変化が 3 次元でより詳細に観察された (図 3)。

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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  処理した内皮細胞 (T $\beta$ -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 4A)。その結果、EndoMT の進展 (EC  $\Rightarrow$  T $\beta$ -EC  $\Rightarrow$  Partial  $\Rightarrow$  Full) とともに段階的に VEGFR2 の発現が減少し、 $\alpha$ SMA の発現が上昇することが見出された。

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 $\beta$ -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 CD40 の発現は T $\beta$ -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが明らかとなった。

また、CD40 の発現を siRNA で低下させたところ、TGF- $\beta$  による  $\alpha$ SMA ならびに TGF- $\beta$  ファミリーメンバーである Activin の発現上昇が亢進することが示された (図 4B)。

### 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、EndoMT レポーター細胞を用いた本実験系は、EndoMT 移行段階を検出・分取できる初の解析システムである。この実験系により、EndoMT は段階的に起こっていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった(図 4C)。

## 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 レポーター細胞によって同定した EndoMT 制御因子を標的とした治療薬を開発することでナノマテリアルの曝露に対する治療法の開発につなげたい。

## 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†, Kobayashi M†, Katsumata H, Tokizaki S, Anzai T, Ikeda Y, Alcaide D, Maeda K, Ishihara M, Tahara K, Kubota Y, Itoh F, Park J, Takahashi K, Matsunaga Y, Yoshimatsu Y, Inoue KA, Watabe T (†: contributed equally). CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing partial EndoMT in tumor microenvironment. *Cancer Science*. 2024 115(2):490-506. doi: 10.1111/cas.16045. †: co-first author (equal contribution)

Tokisaki S, Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi K, Kobayashi M, Ibi H, Uchida S, Iwabuchi S, Harada H, Hashimoto S, Miyazono K, Shirouzu M and Watabe T. Inhibition of TGF- $\beta$  signals suppresses tumor formation by regulation of tumor microenvironment networks. *Cancer Science*. 2024 Jan;115(1):211-226. doi: 10.1111/cas.16006.

### 2. 学会発表

小林 美穂, 廣瀬 穂香, 中山 雅敬, 渡部 徹郎. 加齢に伴う微小血管密度の低下におけるストレス応答性の役割. 第 31 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2023) 神戸 2023 年 12 月、口演 高橋和樹, 勝又寿枝, 小林美穂, 時崎詩織, 池田行徳, 前田健太郎, 井上カタジナアンナ, 松永行子, 吉松康裕, 渡部徹郎、TGF- $\beta$  による内皮間葉移行(EndoMT)の段階的遷移を EndoMT レポーター内皮細胞は可視化した、第 31 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2023)、2023 年 12 月、神戸、口演

小林 美穂, 藤原 花汐, 廣瀬 穂香, 鈴木 康弘, 小林 ゆめ, 中山 雅敬, 佐藤 靖史, 渡部 徹郎.  $\alpha$ -チューブリンの脱チロシン化によるシグナル伝達調節がもたらす生理的役割. 第 46 回日本分子生物学会年会 神戸 2023 年 12 月、口演

Honoka Hirose, ○Miho Kobayashi, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe, Relationship

between aging-related reduction of microvessel density and endothelial stress tolerance、第 46 回日本分子生物学会年会、2023 年 12 月、神戸、ポスター  
 小林美穂、高橋和樹、藤原花汐、吉岡祐亮、落谷孝広、井上カタジナアンナ、渡部徹郎、口腔がん細胞が放出する細胞外小胞を介した血管不安定化の分子機構、第 96 回日本生化学会大会、2023 年 11 月、福岡、口演

Tetsuro Watabe, Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies. FAOPS 2023 (The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress), 2023.11.01, Daegu, 口演  
 渡部徹郎、がん微小環境ネットワークを制御するシグナルを標的とした治療法の開発。第 64 回日本脈管学会学術総会、2023.10.26, 横浜、口演  
 小林美穂、口腔がん細胞由来細胞外小胞による血管不安定化の分子機構、第 10 回日本細胞外小胞学会学術集会、2023 年 10 月、札幌、口演  
 渡部徹郎、がんの進展における内皮間葉移行の役割。第 82 回日本癌学会学術総会、2023.09.22, 横浜、口演

Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe. Attenuation of the stress response is involved in the age-related reduction of microvascular density. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM2023), 2023.09, Korea, ポスター

Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Hisae Katsumata, Yukinori Ikeda, Tatsuhiko Anzai, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Daniel M Alcaide, Kentaro Maeda, Jihwan Park, Kunihiko Takahashi, Yukiko Matsunaga, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. Endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) reporter cells visualized multiple groups of cells during progression of TGF- $\beta$  induced EndoMT. Asia-Australia Vascular

Biology Meeting 2023 (AAVBM 2023), 2023.09, Korea, 口演  
 Tetsuro Watabe, Characterization of TGF- $\beta$ -induced partial endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) using EndoMT reporter cells. TGF $\beta$  meeting 2023, 2023.08.17, Uppsala, 口演  
 渡部徹郎、がん進展における血管恒常性破綻が果たす役割。日本血管生物医学会第 3 回血管研究会、東京、2023.07.30, 口演  
 渡部徹郎、がん進展における血管恒常性破綻が果たす役割。第 3 回動的恒常性研究会、京都、2023.07.14, 口演  
 渡部徹郎、脈管の恒常性維持とその破綻における TGF- $\beta$  シグナルの役割。第 55 回日本動脈硬化学会総会、2023.07.09, 東京、口演  
 渡部徹郎、健康寿命延伸におけるリンパ管制御の意義。第 23 回日本抗加齢医学会総会、2023.06.10, 東京、口演  
 小林美穂、廣瀬穂香、小林ゆめ、渡部徹郎、微小管の翻訳後修飾と細胞内輸送のダイナミクス、第 75 回日本細胞生物学会大会、2023 年 6 月、奈良、ポスター  
 小林美穂、廣瀬穂香、中山雅敬、渡部徹郎、加齢に伴う脈管減少の分子機構、第 47 回日本リンパ学会総会 2023 年 6 月、浜松、口演  
 小林美穂、健康寿命延伸における血管と微小管との関係、第 8 回血管生物医学会若手研究会 2023 年 5 月、浜松、口演  
 渡部徹郎、がん微小環境の制御による新規治療法の開発。第 31 回日本医学会総会 2023.04.23, 東京、口演

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

出願番号：特願 2023-205003

発明者：渡部 徹郎 高橋 和樹 小林 美穂 井上 カタジナアンナ

発明の名称：部分的内皮間葉移行マーカーとしての遺伝子の発現産物の使

用

なし

出願人：国立大学法人東京医科歯科  
大学

3. その他  
なし

出願日：2023年12月5日

2. 実用新案登録

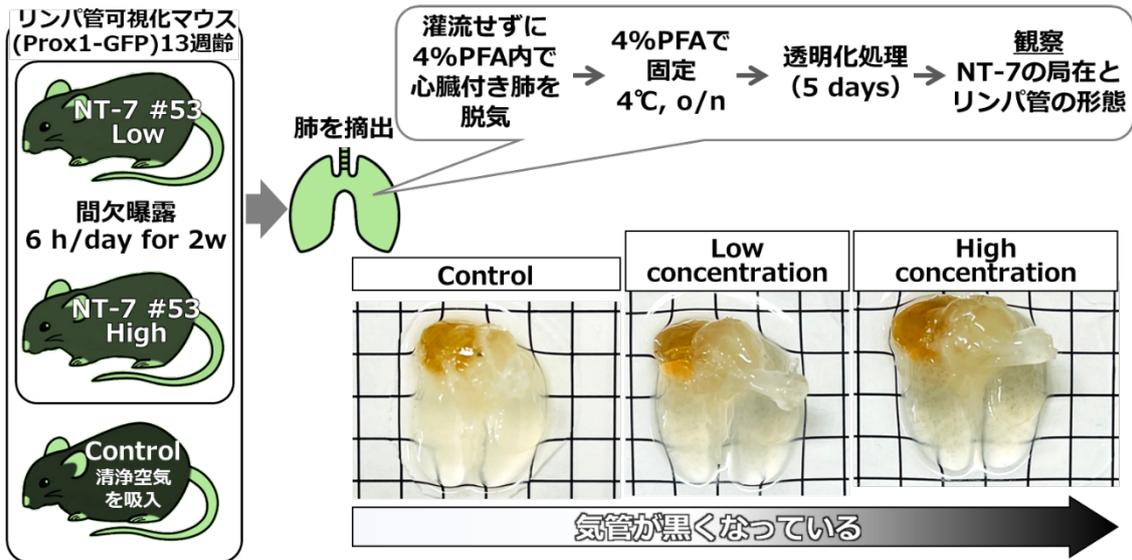


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺の透明化

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。

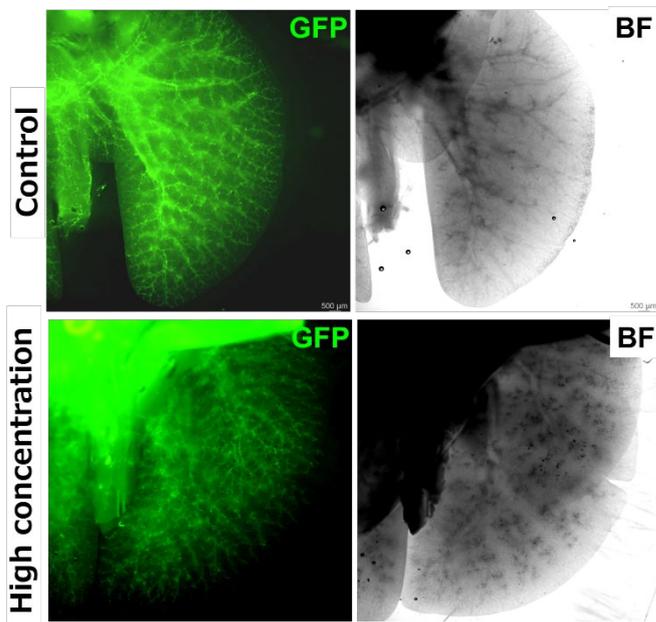


図2. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

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。

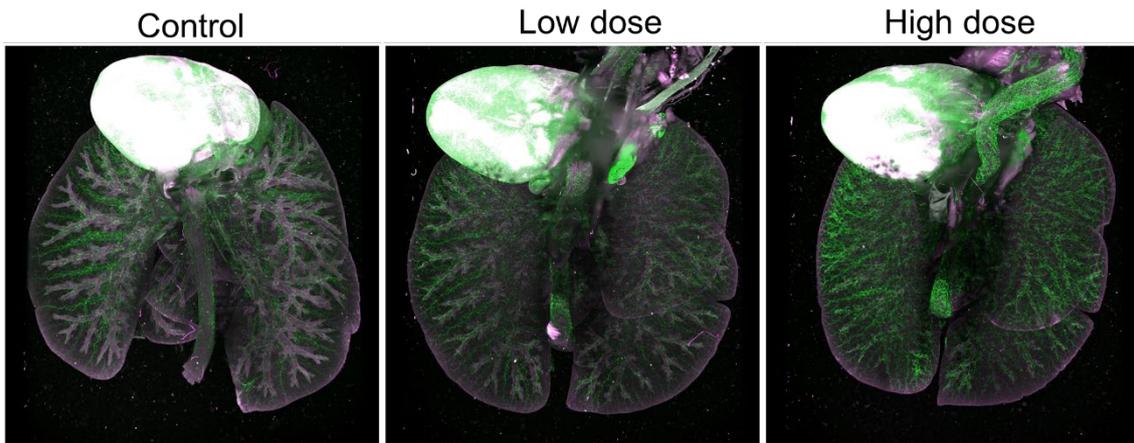


図 3. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

透明化した肺をライトシート顕微鏡で観察した。NT-7 を吸入曝露していない群 (Control) 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、低濃度 (Low dose) そして高濃度 (High dose) で曝露した群ではその構造が用量依存的に乱れていることが観察された。

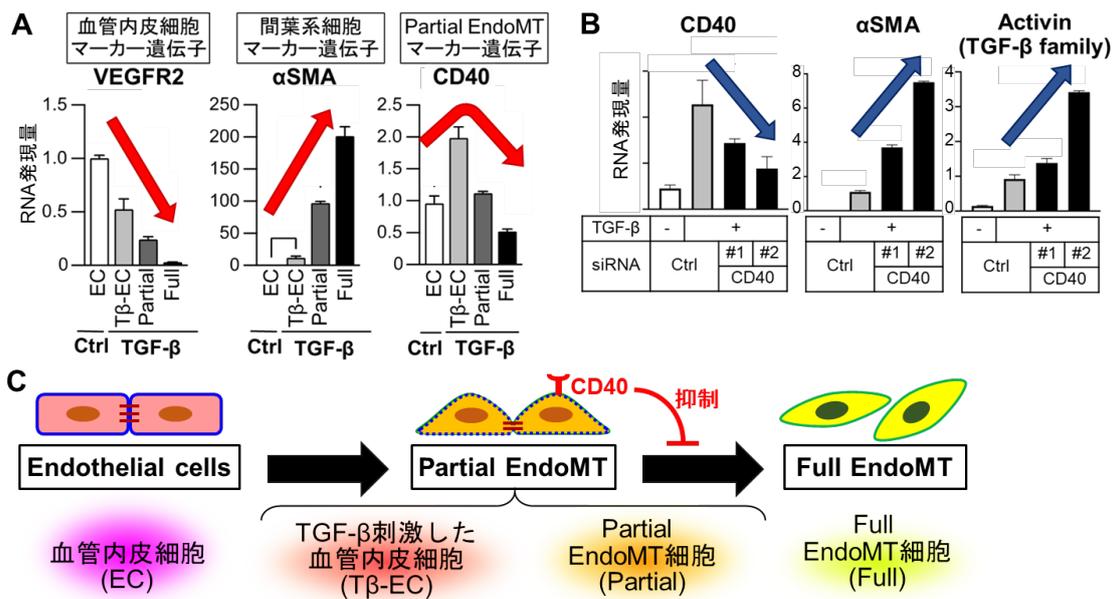


図 4. EndoMT レポーター細胞を用いた Partial EndoMT 特異マーカーの同定

(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 (Tβ-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。EndoMT の進展とともに段階的 VEGFR2 の発現が減少し、αSMA の発現が上昇することが見出された。Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現が Tβ-EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが明らかとなった。(B) CD40 の発現を siRNA で低下させたところ、TGF-β による αSMA ならびに TGF-β ファミリーメンバーである Activin の発現上昇が亢進することが示された。(C) EndoMT レポーター細胞を用いた本実験系は、EndoMT 移行段階を検出・分取できる初の解析システムである。この実験系により、EndoMT は段階的に起こっていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった。