

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の研究

令和6年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージ細胞株を用いた微粒子応答の解析

研究分担者	石丸 直澄	東京科学大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究協力者	牛尾 綾	東京科学大学大学院医歯学総合研究科
	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6年度の本分担研究では、Taquann 処理した二酸化ケイ素（NM202）の全身吸入曝露による BALF 細胞中の肺胞マクロファージの動態をフローサイトメトリー解析、マクロファージ関連遺伝子の mRNA 発現の qRT-PCR による解析、病理学的解析を実施した。加えて、RAW264.7 細胞への NM202 添加による *in vitro* での解析を実施した。NM202 の全身吸入曝露後 4 週および 8 週での肺胞細胞の細胞数、M1/M2 マーカーに関して対象群と変化はなかった。肺の病理組織学的変化として、NM202 曝露によって肺胞腔の軽度の狭窄および肺胞マクロファージの集簇像が確認された。BALF 細胞における Marco mRNA の発現が曝露濃度に依存した上昇が観察された。一方、RAW264.7 細胞への LPS 刺激存在下、非刺激下の両方で NM202 を添加すると MARCO の表面発現の有意な増加が認められた。以上の結果から、NM202 の吸入曝露では肺組織での炎症の起点は弱く、多層カーボンナノチューブなどに比較して免疫毒性は低いものと考えられる。マクロファージの NM202 に対する反応性は MARCO 分子が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

R6 年度の本研究では、二酸化ケイ素（NM202）の全身吸入曝露による肺免疫への影響について、BALF 細胞を用いて各種の解析を実施した。さらに、RAW264.7 細胞を用いて、NM202 に対する詳細な免疫学的解析を加えた。NM202 を用いた *in vivo* および

in vitro の実験により、ナノシリカの免疫毒性の検証と新たなバイオマーカーの探索を目指した。

B. 研究方法

Taquann 処理を施した NM202 を 0、15、30 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間 5 日間の暴

露を全身暴露装置を用いて実施した。本実験では雄 C57BL/6NCrSlc マウスを用いた（8週齢、各群 N=5）（図 1）。暴露後 4 週および 8 週目で屠殺解析を実施した。BALF 細胞、肺組織、頸部リンパ節、脾臓のサンプリングを行なった。

BALF 細胞、頸部リンパ節細胞、脾細胞を用いて、各種表面抗原に対する抗体を用いてフローサイトメータ (Cytotflex, Coulter) による解析を行なった。用いた抗体は、FITC、PE、PE-Cy7、APC または APC-Cy7 標識 CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、CD192、CD206、抗体 (BioLegend) である。

BALF 細胞から 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'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', *Marco*; (f) 5'-GAAGACTTCTTGCGGCAGCAC-3', (r) 5'-CTTCTTGCGCACTGGATCAT-3' *Il1b*; (f) 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3', (r) 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTT-3', *Mcp1*; (f) 5'-CTGGATCGGGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3', *Actb*; (f) 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

マウス細胞株 RAW246.7 を用いて、無血清培地 (Gibco) による培養条件にて Taquann 処理を施したナノシリカ (NM202) に対する反応を検討した (図 1)。マクロファージの活性化も目的に Lipopolysaccharide (LPS; Sigma, 5 ng/mL) を用いた。細胞数、細胞径は自動測定装置 (Luna-II™) を使用した。また、細胞表面マーカーとして、CD192, CD54, CD86, MARCO, CD206, CD36, CD163, MHC class II に対する標識抗体を用いて、フロー

サイトメータにて解析を実施した。

(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東京科学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

NM202 の全身吸入暴露実験

対照群、低濃度 (15 mg/m³) 暴露群、高濃度 (30 mg/m³) 暴露群の 4 週後の BALF の変化として、暴露によって BALF 中の肺泡マクロファージ (F4/80⁺CD11c⁺) の割合ならびに細胞数は減少しているものの有意な差は認められなかった (図 2)。8 週後の肺泡マクロファージの変化でも、低濃度暴露群で割合、細胞数ともに増加していたが、有意な差ではなかった (図 2)。NM202 暴露による肺泡マクロファージの M1/M2 への分化パターンの変化をフローサイトメータで検討すると、低濃度および高濃度暴露によって対照群と比較して有意な変化は観察されなかった (図 3)。脾臓、頸部リンパ節における NM202 吸入暴露によるマクロファージ分画の変化は認められず (図 4、5)、M1/M2 への分化についても NM202 暴露による影響は確認できなかった (図 6、7)。一方で、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞分画 (CD4/CD8) については、NM202 暴露による割合、細胞数に有意な変化は認められなかった (図 8、9)。さらに、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞の活性化状態

(Effector/Naiive) を CD44 ならびに CD62L を指標にすると (Effector: CD44^{high}CD62L⁻, Naiive: CD44^{low}CD62L⁺)、脾臓において NM202 暴露後 6 週にて Naiive CD4⁺T 細胞の割合が有意に増加していることが判明した (図 10)。頸部リンパ節の CD4⁺T 細胞、脾臓および頸部リンパ節での CD8⁺T 細胞に関しては NM202 暴露によって変化は確認できなかった (図 11、12、13)。

NM202 吸入暴露マウスの一部の肺組織の組織学的検討を行うと、暴露後 4 週において胸膜側の一部に肺泡構造が不明瞭な部分が認められ、肺泡マクロファージの軽度の集簇像が確認された (図 14)。暴露後 8 週においても、さらに肺泡腔の不明瞭な領域が広がっており、腔内に肺泡マクロファージの集簇が確認された (図 15)。

NM202 暴露後 8 週での BALF 細胞を用いて、*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA 発現を qRT-PCR にて定量化すると、*Il1b* mRNA はいずれの群も検出限界以下であった (図 16)。*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA ともに対照群に比較して有意な変化は見られなかったが、*Marco* mRNA に関しては濃度依存的に発現の上昇が認められた (図 16)。

RAW264.7 細胞への NM202 の暴露実験

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、*in vitro* での NM202 に対する反応性を検討した。LPS (5 ng/mL) の刺激の有無の条件で、NM202 (250 ng/mL) 添加した時の 48 時間の培養後の形態的变化を確認すると、LPS 刺激下での NM202 添加によって、細胞の大きさが増大することが明らかになった (図 17)。LPS 刺激によって M1 型のマクロファージに分化することが知られており、NM202 添加による各種マクロファージ表面マーカーの変

化をフローサイトメータにて検討した。検討した 8 種類のマクロファージマーカーのうち、MARCO に関して、LPS 非添加ならびに添加状態の両方で NM202 の暴露によって MARCO の表面発現が有意に上昇した (図 18)。また、IL-13 によって M2 型マクロファージに分化することが知られていることから、recombinant IL-13 (50 ng/mL) を添加した上で、NM202 を暴露によって、8 種のマクロファージマーカーの表面発現に変動は認められなかった (図 19)。

さらに、NM202 の濃度変化による MARCO の表面発現の変動を確認すると、2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた (図 20)。加えて、LPS 添加時においても 2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた (図 20)。

NM202 の暴露による Marco mRNA 発現を含め、マクロファージ関連遺伝子 mRNA 発現 (*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco*) を q-RT-PCR にて検討すると、いずれの遺伝子も LPS 刺激で発現が上昇し、NM202 (500 ng/mL) の暴露でいずれの遺伝子発現も上昇傾向にあるが、*Marco* mRNA に関しては 15 倍以上の増加が見られた (図 21)。

D. 考察

NM202 の全身吸入暴露後 4 週および 8 週での BALF 細胞中の肺泡マクロファージに関して、細胞数、表現型ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。頸部リンパ節、脾臓においてもマクロファージ分画に NM202 暴露による変化は観察されなかった。脾臓において、NM202 暴露によって、CD4⁺T 細胞の Naiive 型へシフトが観察されたが、ナノシリカの免疫系への影響は不明な点が多く、何らかの T 細胞活性化機構に影響を及ぼしていた可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

病理組織学的な変化に関しては、各群一部の組織の解析で NM202 暴露で肺胞マクロファージの軽度の集簇領域が確認され、フローサイトメータの結果と乖離が見られる。暴露後 4 週、8 週での採取可能な BALF 中での肺胞マクロファージの動態と実際の組織中での肺胞マクロファージの変化に乖離がある可能性が考えられた。

MWCNT の全身吸入暴露で見られた BALF 細胞数の変化、M1 型への肺胞マクロファージ分画の変化や組織学的な変化とは異なり、NM202 暴露による変化は軽度である可能性があり、ナノマテリアルの形状、性状によって肺胞マクロファージの反応は大きく異なっているものと考えられる。MWCNT の暴露では肺胞マクロファージから産生される MMP12 が重要な役割を果たしていたが、NM202 暴露での BALF 細胞の *Mmp12* mRNA 発現に変化は認められなかった。以前から、ナノシリカを含めナノマテリアルの取り込みに関係している Scavenger receptor の一つである MARCO (*Front Immunol* 9:103, 2018) の mRNA 発現が濃度依存的に増加していたことから、MARCO 分子を介したナノシリカに対するマクロファージの反応が存在しているものと考えられる。

RAW264.7 細胞を用いた実験では、細胞の大きさの変化で判断すると、NM202 を添加しただけでは RAW264.7 細胞による貪食作用は明らかではなく、LPS の刺激によって貪食作用が亢進したものと考えられる。今回の培養系では、出来るだけ直接の NM202 の反応を観察するために、無血清培地を用いた。既報では M2 型マクロファージがナノシリカの貪食作用が亢進することが知られていたが (*Front Pharmacol* 6:55, 2015)、今回の実験系では LPS の刺激で M1 型に誘導した場合に、MARCO の発現に変

化が認められ、IL-13 による M2 型誘導マクロファージでは NM202 暴露による各種マーカーの発現に変化は認められなかった。LPS は TLR4 シグナルの活性化に重要であることから、マクロファージのナノシリカに対する反応性には TLR と Scavenger receptor の相互作用が重要である可能性が示された。

RAW264.7 細胞の Marco mRNA 発現に関しては、LPS 刺激細胞に 500 ng/mL の NM202 を添加すると 35 倍程度の Marco mRNA 発現が上昇したが、2,000 ng/mL ではそれ以上の発現上昇はなかったことから、より低濃度の反応性を再検討する必要がある。また、培養時間、LPS 以外の mitogen 刺激に関しても今後の検討課題である。

E. 結論

In vivo および *in vitro* での NM202 を用いた実験から、ナノシリカの肺における免疫毒性の評価に MARCO 分子を介した反応性の解析が重要である可能性が示された。

形状および性状の異なるナノマテリアルの免疫毒性の評価にはマクロファージを中心とした免疫病理的な手法が有効であることが示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Tsunematsu T, Mouri Y, Shao W, Arakaki R, Ruppert JG, Murano K, Ishimaru N, Guardavaccaro D, Pagano M, Kudo Y. Sustained chromosomal passenger complex activity preserves the pluripotency of human embryonic carcinoma cells. *Sci Signal*. 2024; 18:eadg4626. doi: 10.1126/scisignal.adg4626.

2. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025 doi.org/10.5357/koubyou.92.1_1
 3. Shikama Y, Otsuka K, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2. *BioFactor* 51:e2154, 2024 doi:10.1002/biof.2154.
 4. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. Therapeutic Strategy Based on the Pathogenesis for Sjögren's Syndrome. *J Oral Health Biosci.* 37(1):1-5, 2024 doi.org/10.20738/johb.37.1_1
 5. Nakamura K, Tsukasaki M, Tsunematsu T, Yan M, Ando Y, Huynh NCN, Hashimoto K, Gou Q, Muro R, Itabashi A, Iguchi T, Okamoto K, Nakamura T, Nakano K, Okamura T, Ueno T, Ito K, Ishimaru N, Hoshi K, Takayanagi H. The periosteum provides a stromal defence against cancer invasion into the bone. *Nature* 1634(8033):474-481, 2024. doi: 10.1038/s41586-024-07822-1.
 6. Kobayashi D, Denda M, Hayashi J, Hidaka K, Hohmura Y, Tsunematsu T, Nishino K, Yoshikawa H, Ohkawachi K, Nigorikawa K, Yoshimura T, Ishimaru N, Nomura W, Katagiri T, Kosako H, Otaka A. Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization. *Chem Eur.* e202400014, 2024 doi.org/10.1002/ceur.202400014
 7. Yamada A, Watanabe A, Nara A, Ishimaru N, Maeda K, Ido Y, Kotake K, Asano M, Shinohara Y, Yamamoto T. Longitudinal Analysis of Mitochondrial Function in a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined High-Fat Diet-Induced Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 25:6193, 2024 doi: 10.3390/ijms25116193.
 8. Aota K, Kani K, Ono S, Naniwa K, Momota Y, Fukui M, Ishimaru N, Azuma M. Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Sci Int.* 21:415-424, 2024 doi.org/10.1002/osi2.1241
 9. Ushio A, Matsuda-Lennikov M, Kalle-Youngoue F, Shimizu A, Abdelmaksoud A, Kelly MC, Ishimaru N, Takahama Y. Functionally diverse thymic medullary epithelial cells interplay to direct central tolerance. *Cell Rep.* 43:114072, 2024 doi: 10.1016/j.celrep.2024.114072.
 10. 大塚邦紘, 石丸直澄 : Sjögren 症候群の病理 皮膚病診療 46(9):788-79, 2024 doi.org/10.24733/pd.0000003905
- F.2 学会発表
1. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. A crucial role of autophagy in neonatal thymus in autoimmunity. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.3)
 2. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of regulatory mechanism for T cell activation via Trat1 in Sjögren's syndrome.

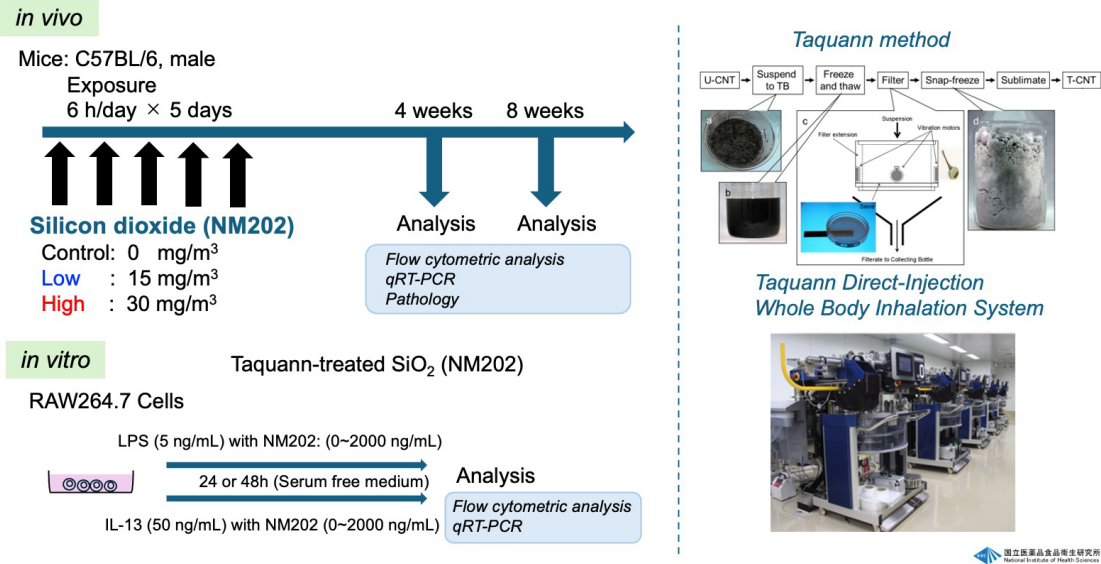
第 53 回日本免疫学会総会学集会
(2024.12.5)

3. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ishimaru N,
Yasutomo K. Salivary gland fibroblasts drive
autoimmune pathology via the interaction
with CD4⁺ T cells in Sjögren's syndrome. 第
53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

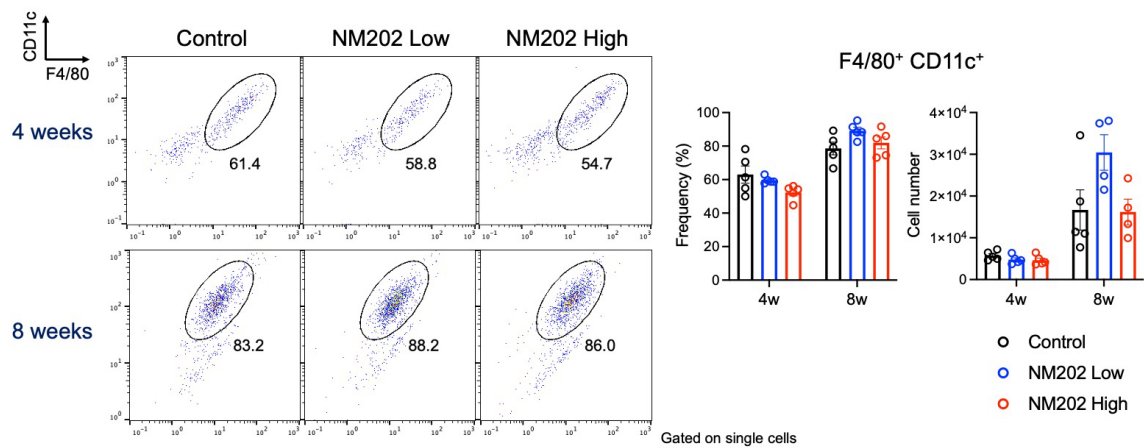
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

☒ 1 Influence of exposure to silica nanoparticles on pulmonary immune response



☒ 2

Effect of inhalation exposure to NM202 on alveolar macrophages



Number of alveolar macrophages was not altered during 4 to 8 weeks after exposure to NM202.

图 3

M1/M2 macrophage polarization in BALF cells by inhalation exposure to NM202

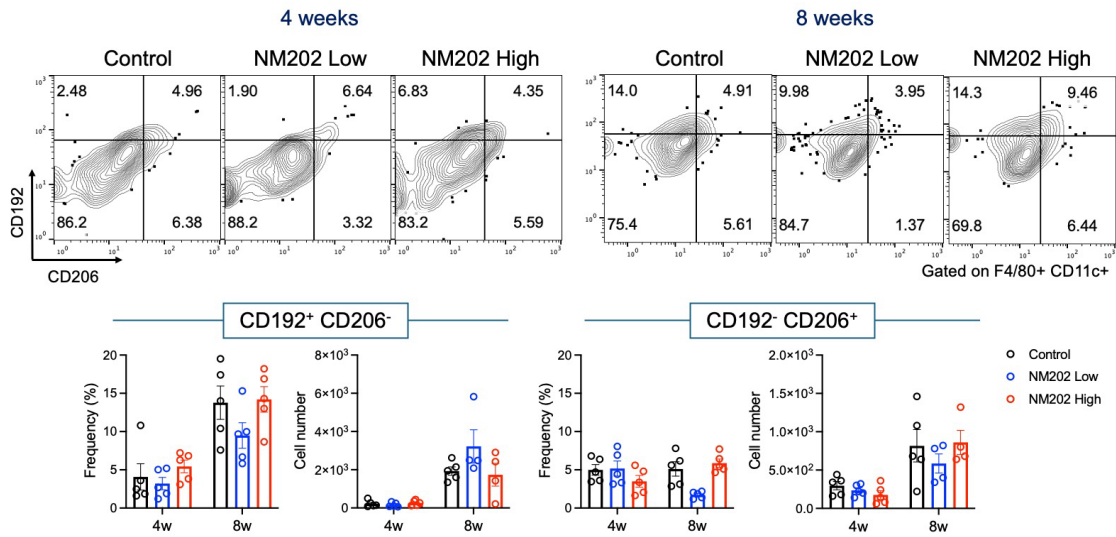


图 4

Effect of NM202 exposure for macrophages in the spleen

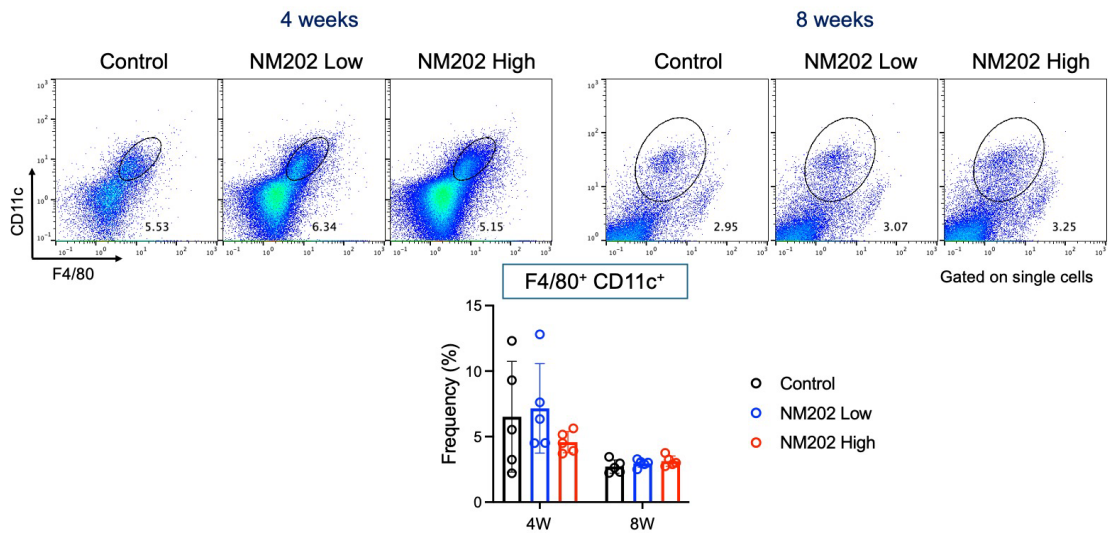


图 5

Effect of NM202 inhalation for macrophages in cLN

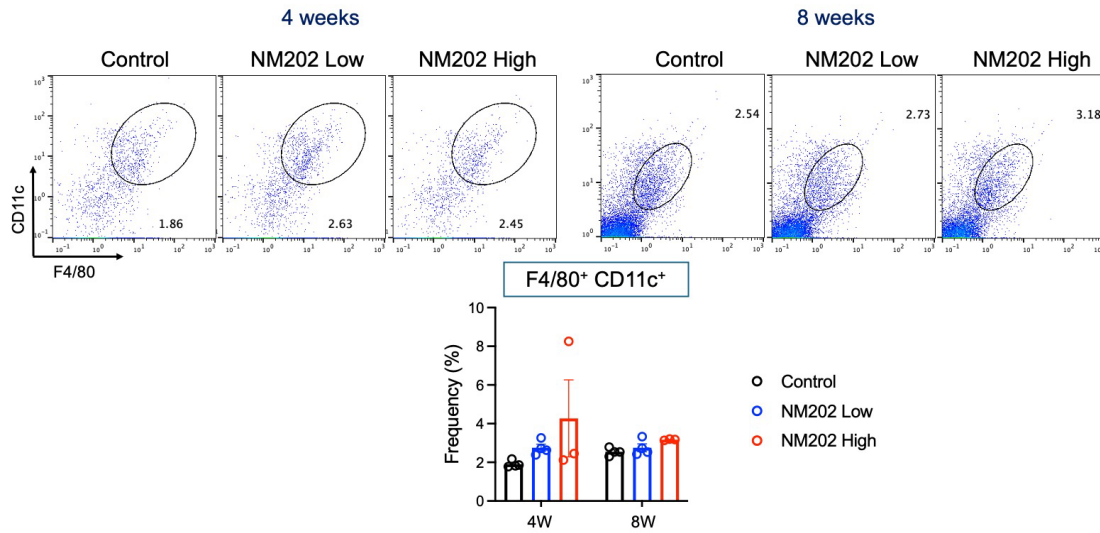
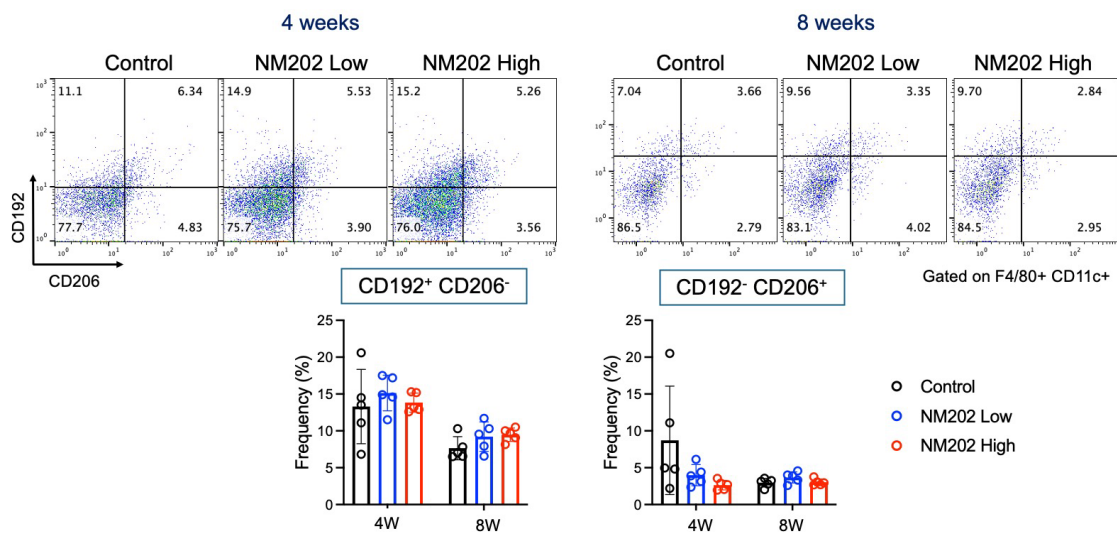


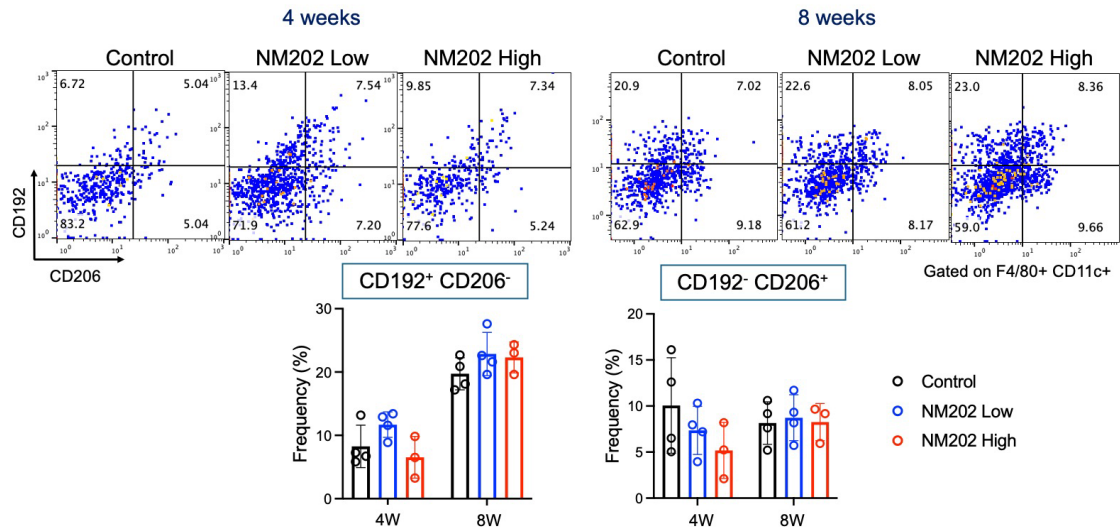
图 6

M1/M2 macrophage polarization by NM202 exposure in the spleen



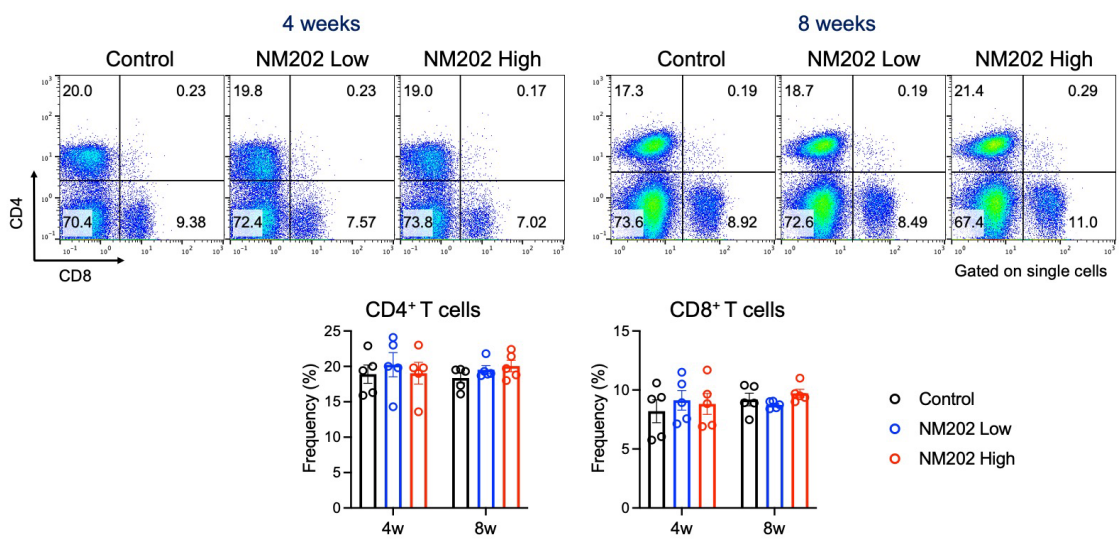
7

M1/M2 macrophage polarization by NM202 exposure in cLN



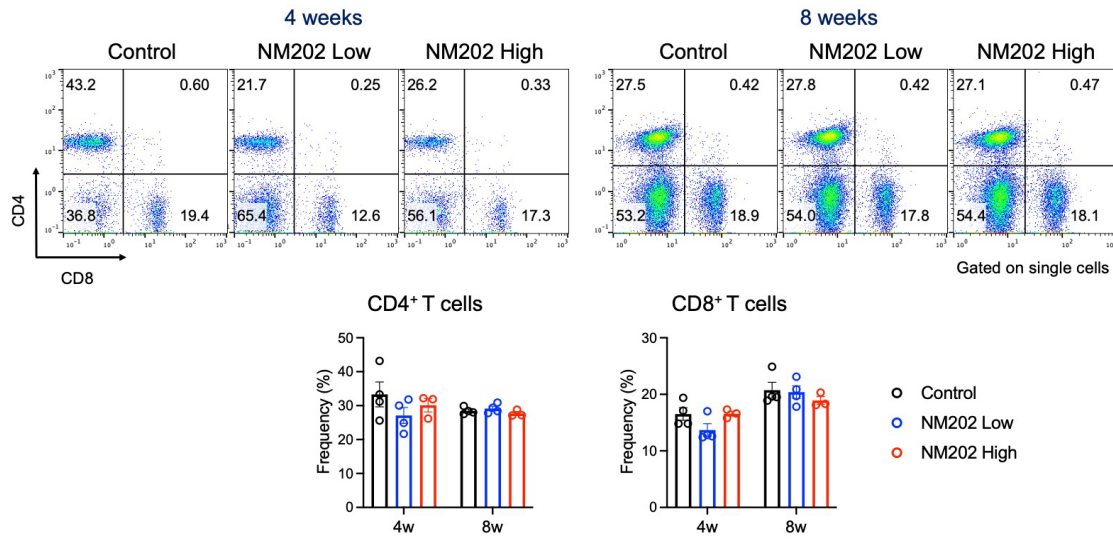
8

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen



9

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN



10

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen

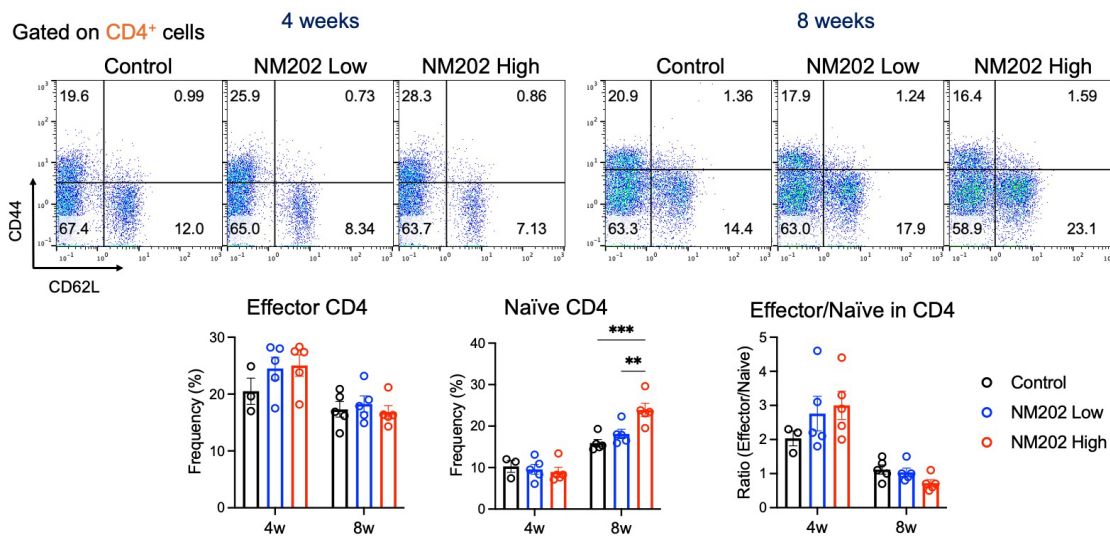


Figure 11

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN

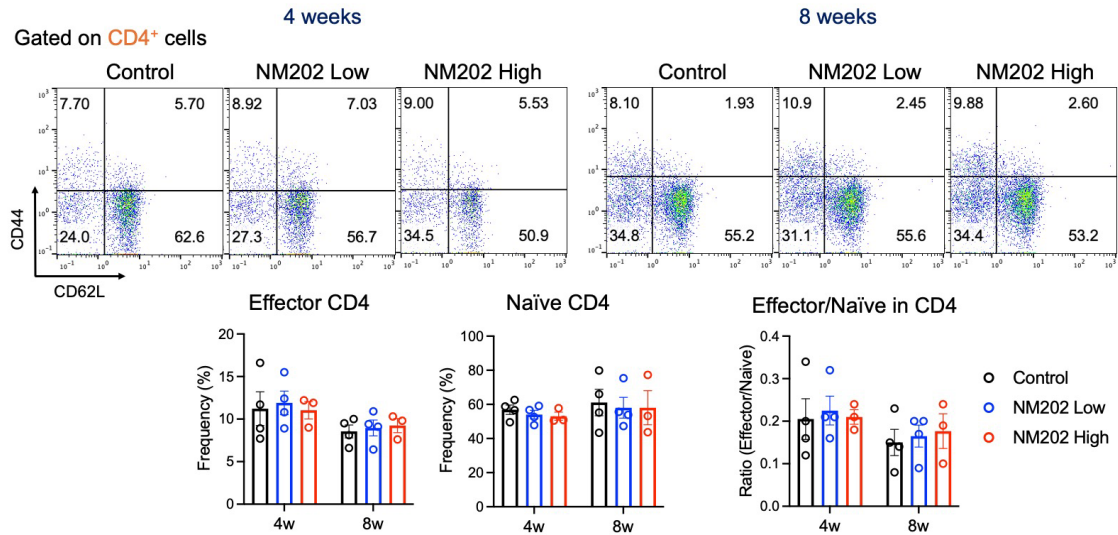
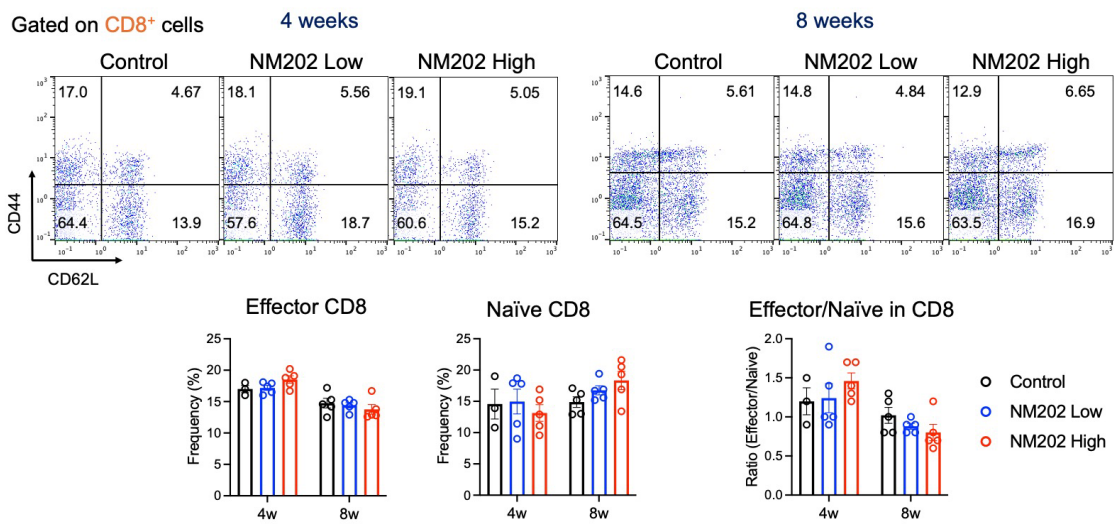


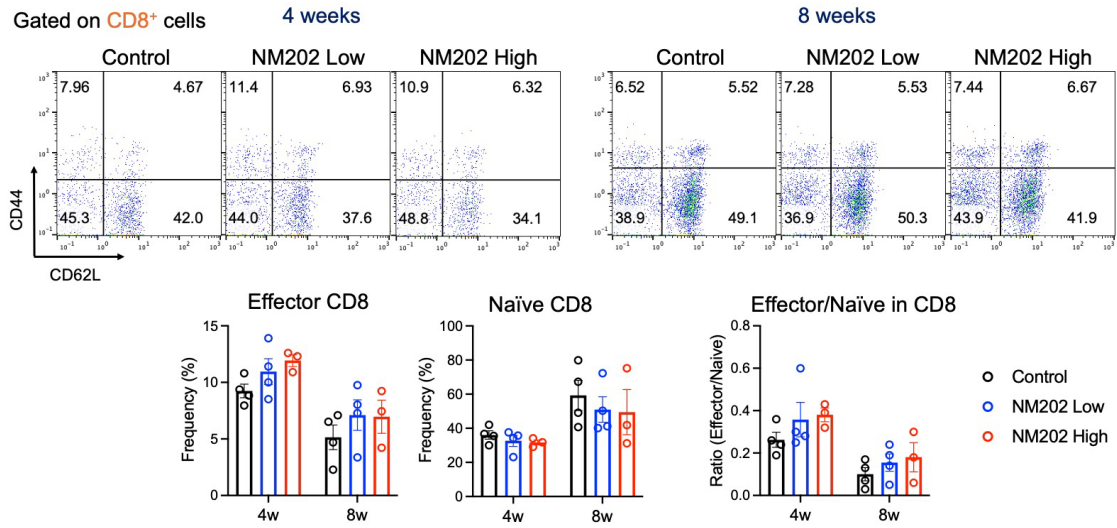
Figure 12

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen



13

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN



14

Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202

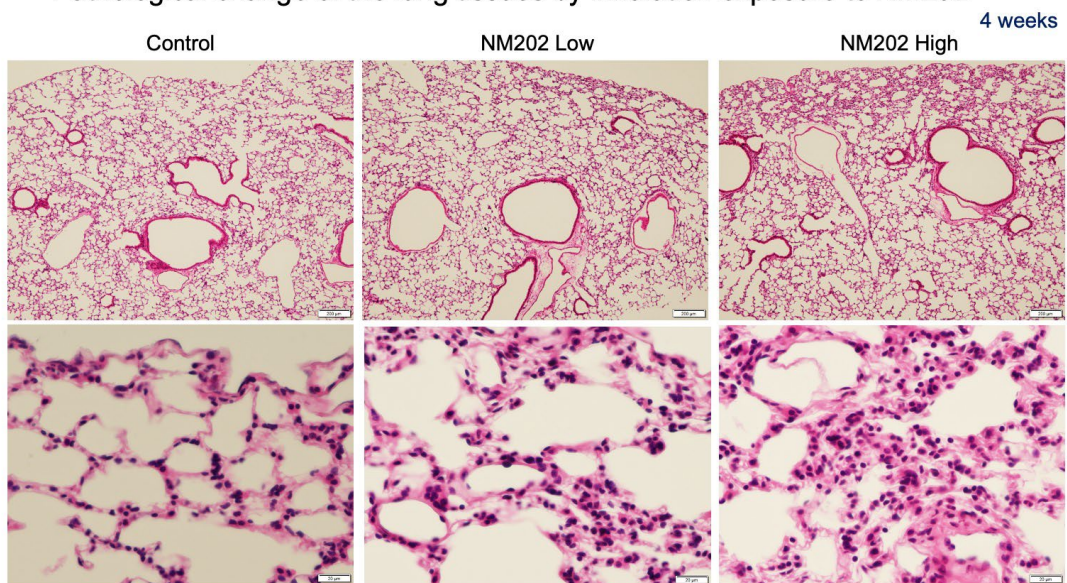


Figure 15 Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202

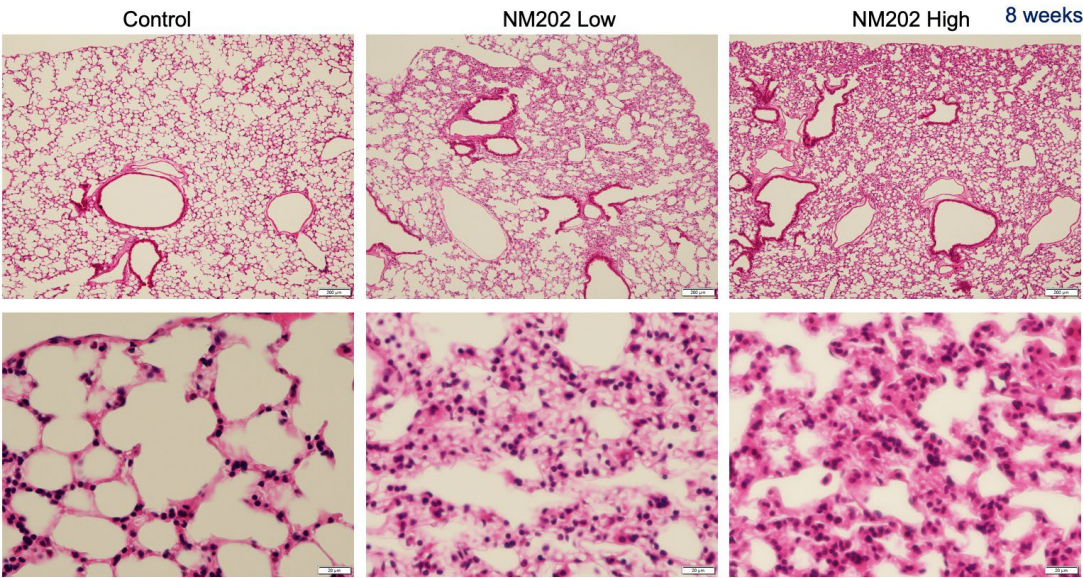
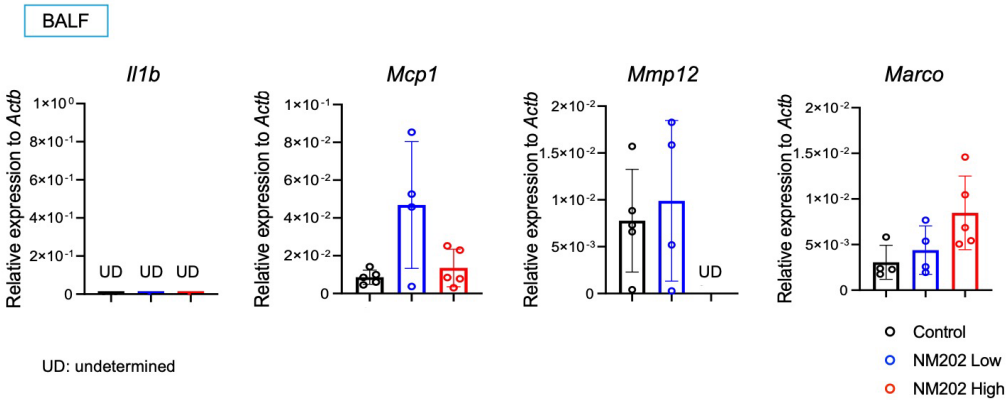
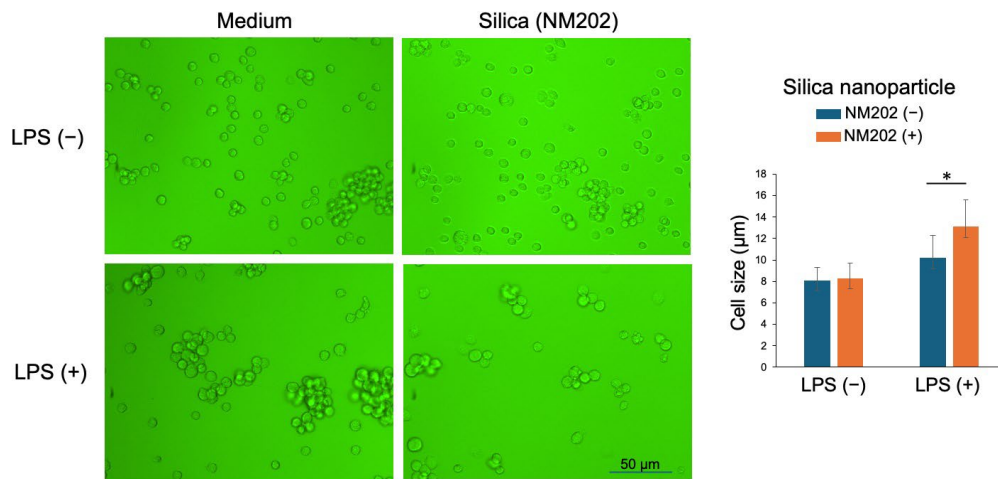


Figure 16 *Marco* mRNA expression of the BALF cells from the NM202-exposed mice



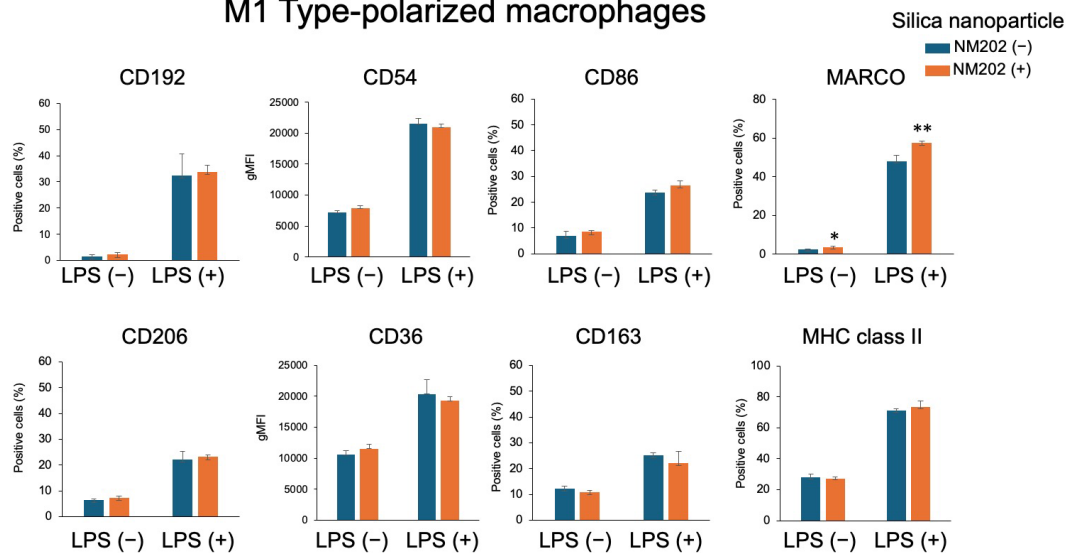
Macro mRNA expression was dose-dependently increased at 8 weeks after the exposure to NM202.

17 Morphological change of RAW-264.7 cells exposed to silica (NM202)



Size of LPS-stimulated RAW-264.7 cells was increased by exposure to NM202.

18 Effect of exposure to NM202 on Surface Molecules of M1 Type-polarized macrophages



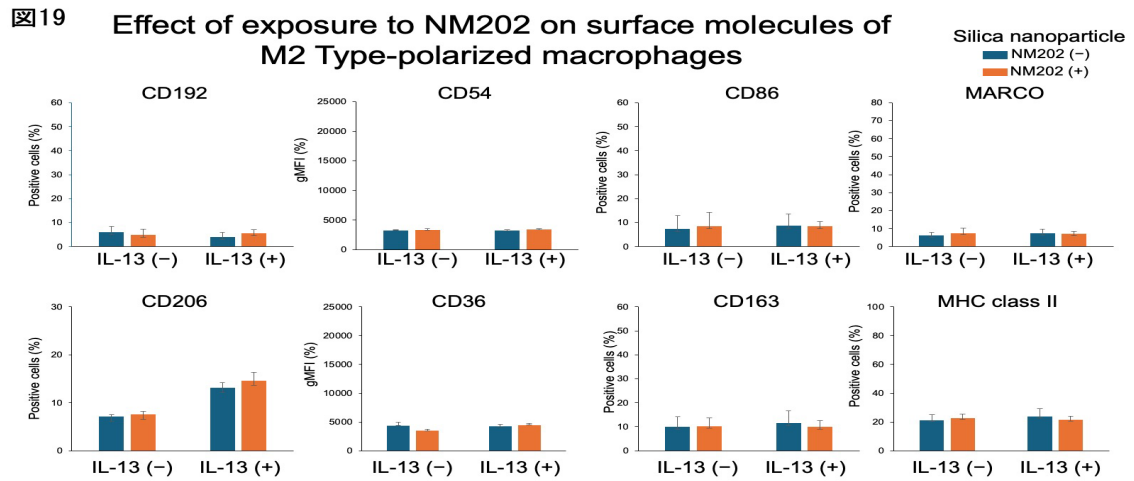


Figure 20: MARCO Expression on RAW-264.7 Cells by Exposure to Silica Nanoparticles

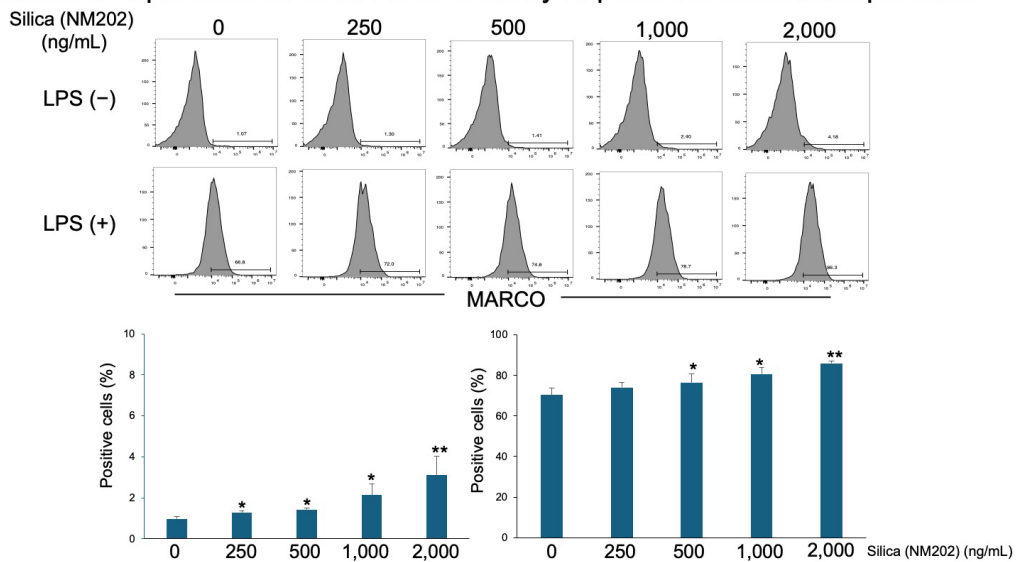


图21

Macrophage-related mRNA expression change by NM202 exposure in LPS-stimulated RAW264.7 cells

