

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和2年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

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	
	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	
	栗形 麻樹子	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2年度の本分担研究では、*in vivo* において針状酸化チタン (TiDW) の吸入曝露による肺の免疫システムに関して、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞を中心に細胞表面分子、サイトカイン、ケモカインおよび炎症関連分子の遺伝子およびタンパク発現を免疫学的手法にて検討を加えた。さらに、NM とマクロファージの MMP-12 の役割に関して、*in vitro* での実験系を確立して検討を進めた。

Taquann 処理した TiDW の吸入曝露後、4 週および 8 週経過時点で BALF 細胞における肺胞マクロファージ (AM) の細胞数、各種分画に関して、対照群との有意な差は観察されなかった。TiDw 曝露後 8 週において、CD54⁺AM の割合が対照群に比較して有意に増加していた。

in vitro での RAW264.7 細胞および THP-1 細胞を用いて、Taquan 処理 MWCNT (T-CNT) による刺激では MMP-12 mRNA 発現が上昇することが判明した。また、T-CNT を処理された RAW264.7 細胞の培養上清を用いた実験で、NIH3T3 線維芽細胞における Col1A2, Col3a1, ColIIV, smooth muscle actin を含む線維化に関与する遺伝子 mRNA 発現が上昇していた。

NM の形状あるいは性状によって曝露に対する免疫反応が大きく異なっている可能性が示された。一方で、MWCNT に対する免疫反応に関して、マクロファージの MMP-12 を介した慢性化・線維化への機序の存在が示唆された。

A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) の暴露による生体への影響については、様々な角度から研究が進展してきた。特に、多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) を用いたマウスへの吸入暴露実験では、肺胞マクロファージの活性化、貪食、細胞死の分子機序が明らかにされてきた。一方で、NMの組成、性状、形状などの違いで、マクロファージを中心とした免疫反応が大きく異なることも知られている。本研究では、NMの性状に基づいた免疫反応の違いを吸入暴露による *in vivo* の研究からその詳細な分子機序を明らかにすることを目的としている。さらに、*in vitro* で NM のマクロファージへの直接の影響を探索できるモデル系を確立して、*in vivo* の実験に対応しうるシグナル分子機構の解明を目指す。

令和2年度での *in vivo* の研究として、針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露による短期毒性の評価を実施するとともに、RAW246.7 細胞あるいは THP-1 細胞、さらに、線維芽細胞を用いて MWCNT に対する炎症・免疫反応の分子機序の解明を目指したモデル系の確立を目指した。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 5 匹ずつで Taquann 処理した針状酸化チタン (TiDW: Titanium dioxide whisker / FTL-300) を吸入暴露装置 (国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、吸入後 4 週及び 8 週で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, CD136 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 (未解析)。

・*In vitro* 実験系

マウス単球細胞株 RAW264.7 ならびにヒト細胞株 THP-1、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 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

培養系の細胞からの RNA 抽出に関しても通法に従い全 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'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAACTTTTAGT-3', TGF- β 1: forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', and reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGTCAG-3'; Col1A2: forward, 5'-CCAAGGGTAACAGTGGTGAA-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3'; Col3A: forward, 5'-AACGGAGCTCCTGGCCCCAT-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3'; Col IV: forward, 5'-ATGCCCTTCTCTTCTGCAA-3' and reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3'; mSMA-F: GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA mSMA-R: ACTGGGACGACATGGAAAAG β -actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGG-3'。なお、BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した（未解析）。

（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

TiDWの吸入暴露実験

TiDWの吸入暴露後4週での肺胞洗浄液（BALF）中の細胞数は、対照群と有意な差はないものの、増加する傾向にあった（**図1 A**）。暴露後8週においてもTiDW暴露群と対

照群では有意な差は認められなかった（**図1 A**）。BALF細胞の直径に関しては、暴露後4週ならびに8週で、TiDW暴露群と対照群で差は見られなかった（**図1 B**）。

BALF細胞に関して、フローサイトメータを用いて、各種免疫細胞分画を解析したところ（**図2**）、血球系細胞（CD45.2⁺）中の肺胞マクロファージ（AM）、好酸球（Eo）、単球（Mo）の割合に関して、暴露後4週では対照群とTiDW暴露群では差が認められなかった（**図3 A**）。また、AMならびにMoを含めたF4/80⁺（未熟ならびに成熟AMを含む）の細胞分画においても両者で差は見られなかった（**図3 A**）。さらに、F4/80⁺AMにおける各種マクロファージ分画を検討してみると、CD11b（正常マクロファージでは陰性）、CD192（M1マクロファージマーカー／炎症性）、CD206（M2マクロファージマーカー／抗炎症性）分画に関して、対照群とTiDW暴露群で差は認められなかった（**図3 A**）。暴露後8週における解析においても、AM、Eo、MoならびにF4/80⁺AM分画の割合はTiDW暴露で変化は認められず（**図3 B**）、F4/80⁺AMの各種分画においても両者で変化は観察されなかった（**図3 B**）。それぞれの分画での経時的変化を検討すると、Eo、Mo、さらに、CD11b⁺AM、CD192⁺AM、CD206⁺AMでの4週と8週での割合に変化はあるものの、対照群とTiDW暴露群では有意差は観察されなかった（**図4**）。

BALF細胞中のF4/80⁺AMにおける活性化マーカーとして、CD54/ICAM-1の発現に関して検討すると（**図5 A**）、暴露後4週では対照群とTiDW暴露群では変化は認められなかったが（**図5 B**）、暴露後8週では、TiDW暴露によって対照と比較して有意に陽性分画が上昇していた（**図5 B**）。また、CD54の発現を蛍光強度によって検討したところ、暴

露後4週では対照群とTiDW暴露群では変化は見られず、暴露後8週では、割合と同様に対照群に比較してTiDW暴露群で高い値を示していたが、有意な変化ではなかった(図5C)。

また、スカベンジャー受容体の一つであるCD136 (macrophage-stimulating protein receptor, protein-tyrosine kinase 8)の発現に関して検討を加えたところ、暴露後4週から8週で全体に発現の上昇は見られたものの、対照群とTiDW暴露群のAMにおける変化は観察されなかった(図5D)。さらに、CD136⁺CD54⁺細胞の割合に関しても、暴露後4週から8週での増加は見られたものの、対照群とTiDW暴露群では有意な変化は認められなかった(図5E)。

一方で、脾臓におけるCD54およびCD136の発現を確認したところ、暴露後4週ならびに8週において、対照群とTiDW暴露群でいずれも変化は観察されなかった(図6)。

In Vitroの実験

RAW264.7細胞にT-CNT (125 ng/ml)を添加して24時間経過後、トリパンブルー染色を施し細胞の形態を顕微鏡にて観察すると、対照細胞に比較してT-CNT細胞の刺激では細胞質が広がり、細胞が大きくなっていることが明らかになった(図7A)。細胞の直径を自動計測装置で測定すると、T-CNT暴露にて有意に長くなることがわかった(図7B)。また、トリパンブルー染色を用いた生死を評価すると、T-CNT添加細胞で対照細胞に比較して、有意にcell viabilityが低下することが判明した(図7C)。T-CNT処理細胞におけるMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCRで検討すると、対照細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇していた(図7D)。さらに、RAW264.7細胞をT-CNTで24時

間した際の培養上清をNIH3T3細胞に添加後24時間での線維化関連因子のmRNA発現を定量RRT-PCRで検討すると、対照上清にて刺激した細胞に比較して、Col1A2、Col3a1、ColIV、smooth muscle actin (SMA)のmRNA発現が有意に高い値を示していた(図8)。一方で、ヒト単球細胞株のTHP-1細胞を用いて、T-CNTの刺激を加えると、100 ng/mlでの刺激では対照処理細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上がっているが、RAW264.7ほどの上昇効果はなかった(図9)。そこで、THP-1細胞のT-CNT刺激にLPSを共に刺激を加えると、LPS刺激のみの細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇した(図9)。

D. 考察

針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露後、4週間および8週間経過した時点でのBALF細胞の変化を検討したところ、細胞数、細胞の大きさに関して、対照群との有意な差は見出せなかった。さらに、肺泡マクロファージ、好酸球、単球の割合に関しても、TiDWの暴露による変化は4週、8週で観察されなかった。また、肺泡マクロファージのM1/M2タイプへの分化にもTiDWの暴露による影響は確認できなかった。T-CNT暴露によりCD11b⁺AMが増加することが報告されているが(PLoS One 2018)、TiDW暴露での変化は観察されなかった。8週までの経時的変化に関しても、対照群とTiDW暴露群で差は確認されなかった。肺泡マクロファージの活性化に関して、CD54⁺細胞が暴露8週においてTiDW暴露群が対照群に比較して有意に上昇していたことから、AMの活性化の指標として有用である。スカベンジャー受容体の一つであるCD136に関しては、この暴露系では変化が認められなかった。本吸入暴

露実験において、針状酸化チタンの暴露ではMWCNTの暴露で見られたような大きな変化は観察されなかったNMの形状および性状によって肺におけるマクロファージによる免疫反応は大きく異なっているものと想定される。今後BALFおよび肺組織における各種遺伝子mRNA発現に関して解析、BALF中の炎症性サイトカインの解析などを進める予定である。

*In vitro*の実験では、NMのマクロファージに対する直接的な影響が評価可能になる。今年度の実験ではマウス単球細胞株であるRAW264.7細胞ならびにヒト細胞株であるTHP-1細胞を用いて、*in vitro*でのT-CNTの影響について検討した。すでに、T-CNTの吸入後の慢性影響に関して、T-CNTの暴露でMMP-12を高発現する肺マクロファージが増加することを報告している (PLoS One 2018) ことから、*in vitro*におけるマクロファージへのT-CNT刺激による影響に関して、MMP-12発現を指標に評価検討したところ、*in vivo*で観察された所見を反映する結果が得られた。また、T-CNTの吸入暴露実験においても長期観察にて、肺組織の線維化が進み、コラーゲン (Type IV) の増生が亢進していることを報告している (PLoS One 2018)。今回のT-CNT処理RAW264.7細胞の培養上清を用いた実験系でも、線維芽細胞の線維化増生に関わる因子のmRNA発現が亢進していたことから、マクロファージから産生される因子が線維芽細胞を直接活性化している可能性が示された。MMP-12が直接作用していたかどうかは今後の検討が必要であるが、T-CNTに対する慢性炎症の機序を明らかにする契機になるものと考えられる。また、NMの影響を直接評価できるモデル系として、本培養系は有用であることが示された。

E. 結論

針状酸化チタンの吸入暴露実験では、肺マクロファージの分画に著変が見られなかったことから、NMの形状および性状によって免疫反応に相違がある可能性が示された。T-CNTを用いた*in vitro*の実験によってマクロファージからのMMP-12を介した慢性炎症機転が示唆された。

F. 健康危険情報

本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかった。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. 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. doi: 10.3390/ijms22063239.
2. 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. doi: 10.1084/jem.20201904.
3. 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. doi: 10.3390/ijms22052302.

4. Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit. *J Cell Sci.* 2020, 133(18): jcs251314. doi: 10.1242/jcs.251314.
 5. Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. *Oral Dis.* 2020, doi: 10.1111/odi.13351.
 6. 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学改訂第7版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
 7. 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71 (5) :476-747, 2020 ISSN 0370-9531
- G.2. 学会発表
1. 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第109回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
 2. 石丸直澄 口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第109回日本病理学会総会シンポジウム 2020.7.1-31 (ウェブ)
 3. 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群の標的臓器における IL-33 の役割 第109回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
 4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第109回日本病理学会総会 口演 2020.7.1-31 (ウェブ)
 5. 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、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 ポスター発表 第62回歯科基礎医学会学術大会 2020.9.11-10.9 (ウェブ)
 6. 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第62回歯科基礎医学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」2020.9.11-10.9 (ウェブ)
 7. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究ウェブ講演会 2021.1.28 (ウェブ)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：特記事項なし

図 1

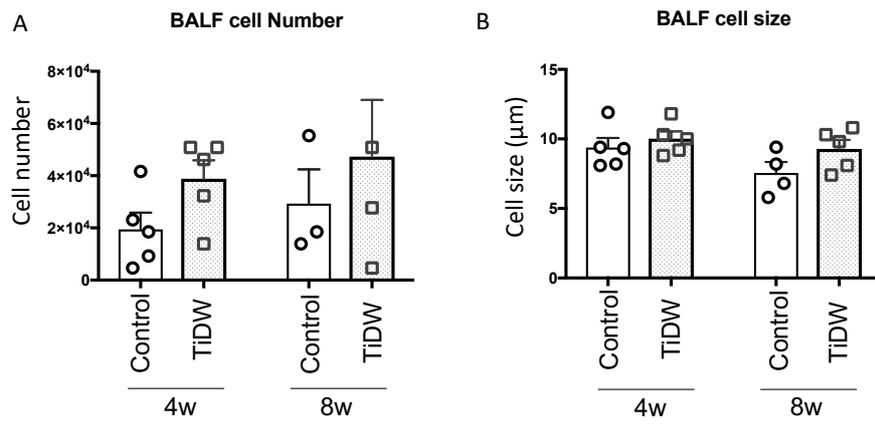


図 1 TiDW吸入暴露後のBALF細胞の変化

A:吸入曝露後 4 週、8 週におけるBALF細胞数 結果(number)=平均値±SD (n=3~5/group)

B:吸入曝露後 4 週、8 週におけるBALF細胞の大きさ 結果(μm)=平均値±SD (n=4~5/group)
細胞数および細胞直径はいずれも自動細胞計測器で測定した。

図 2

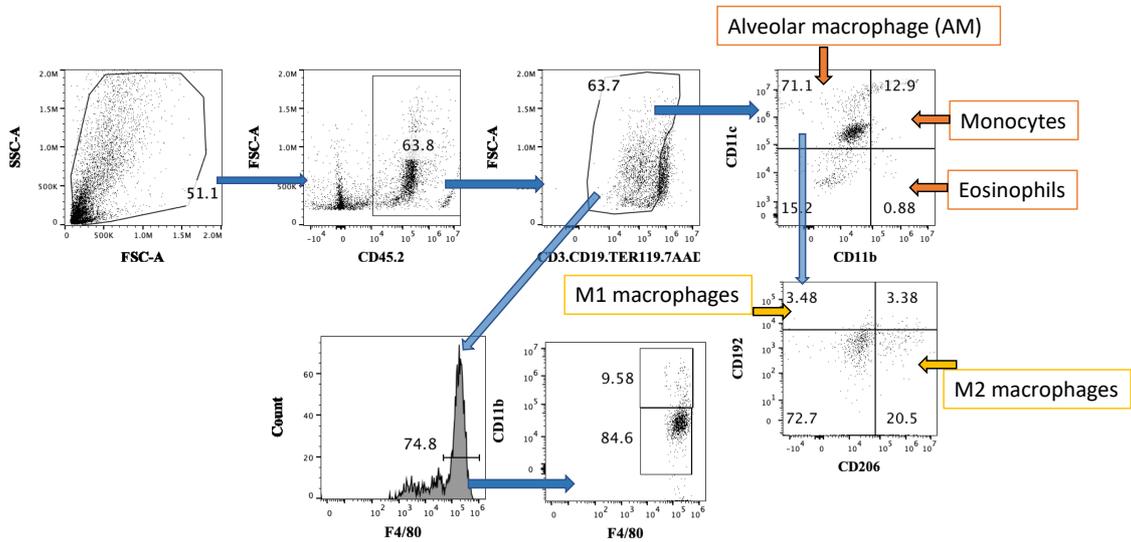


図 2 BALF細胞を用いたGating strategy

採取されたBALF細胞を用いて、各種標識抗体による反応、洗浄、固定後にフローサイトメータによる解析を実施した。SSC/FSC分画にてdebrisなどを除去し、CD45.2陽性血球細胞分画におけるCD3⁺CD19⁻TER119⁻7AAD⁻でゲートをかけた後に、CD11c/CD11bで展開してAM、Mo、Eo分画とした。さらに、AM分画をCD192 (M1マクロファージ)、CD206 (M2マクロファージ)を検出した。一方で、F4/80ならびにCD11bを用いたAM分画を確認した。

図 3

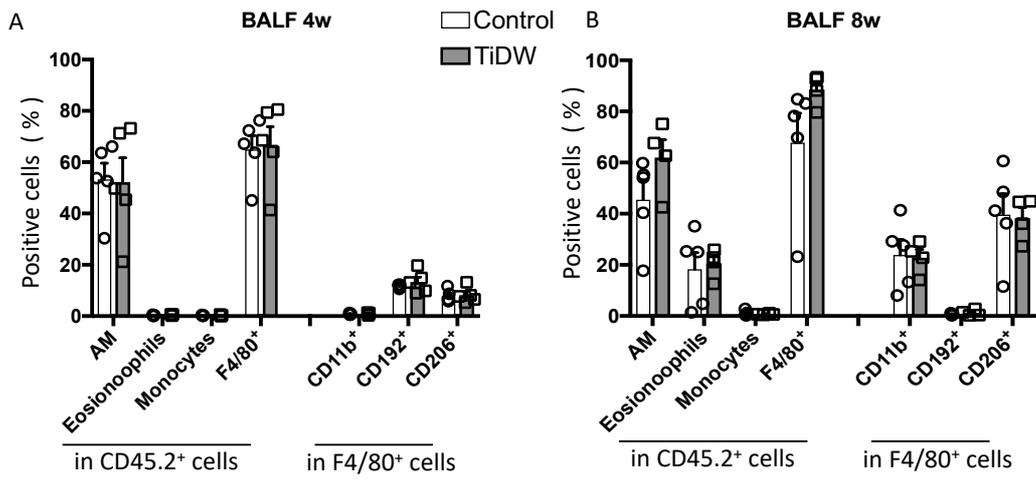


図 3 TiDW吸入暴露後のBALF細胞における免疫細胞分画
 A:吸入暴露後4週におけるBALF細胞における各種免疫細胞分画
 B:吸入暴露後8週におけるBALF細胞における各種免疫細胞分画
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 4

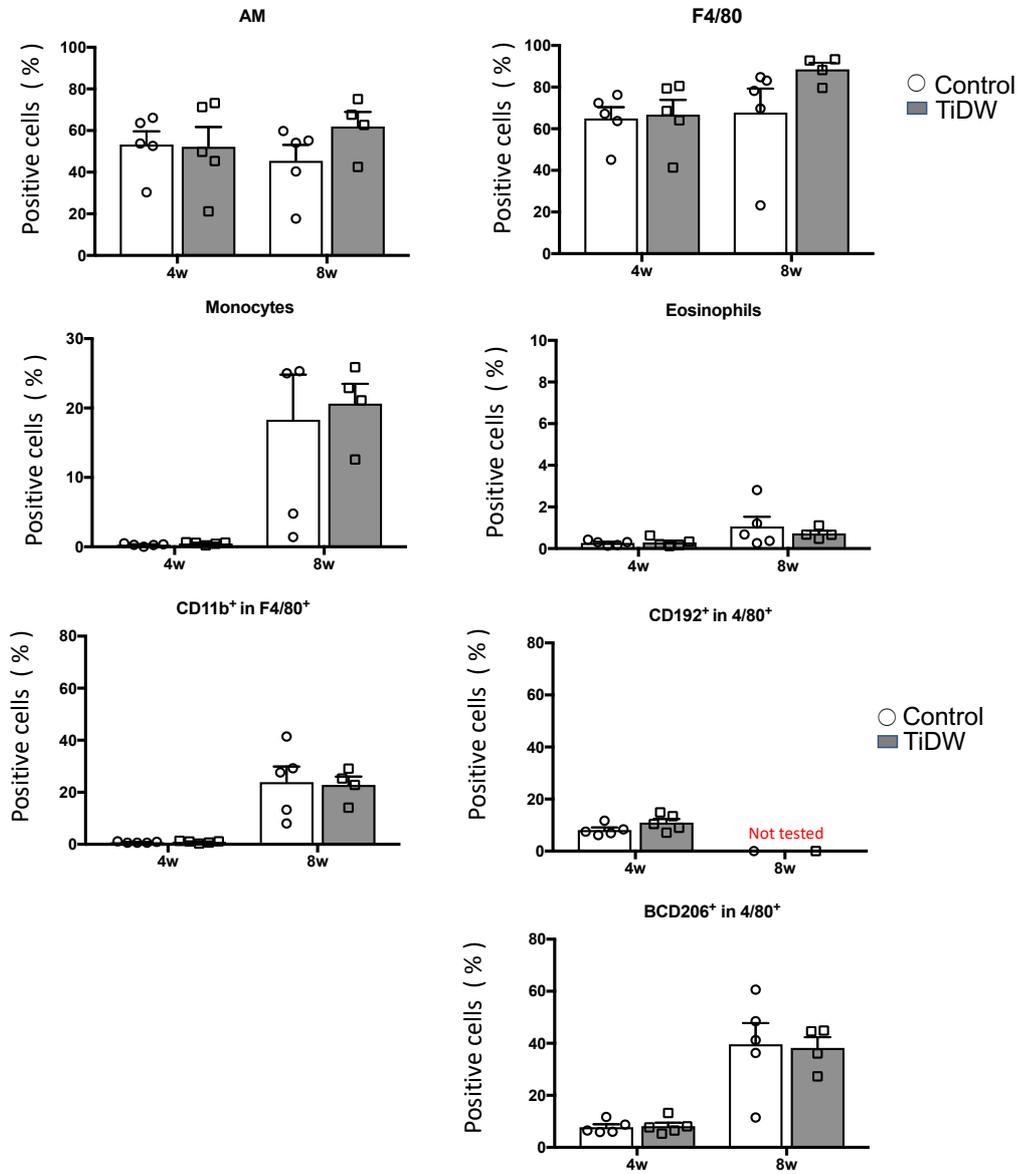


図 4 TiDW吸入暴露後のBALF細胞中の免疫細胞の経時的変化
 吸入暴露後 4 週、8 週における BALF 細胞中における各種免疫細胞およびマクロファージ分画の経時的変化を示す。
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 5

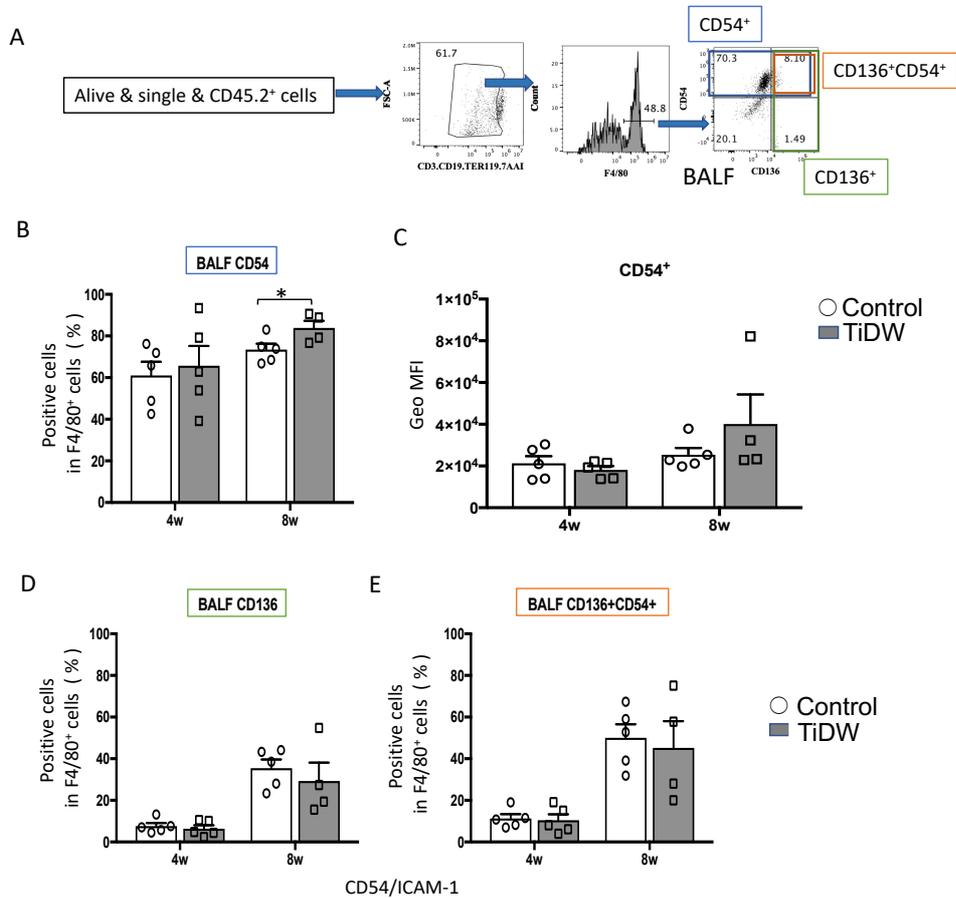


図 5 TiDW吸入暴露後のAMにおけるCD54及びCD136発現
 A: BALF細胞を用いたCD54及びCD136発現解析に関するgating strategy
 B: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD54発現結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group), *p < 0.05
 C: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD54発現結果 (mean fluorescence intensity/MFI) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)
 D: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD136発現結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)
 E: 吸入暴露後4週、8週におけるCD136+CD54+AM結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 6

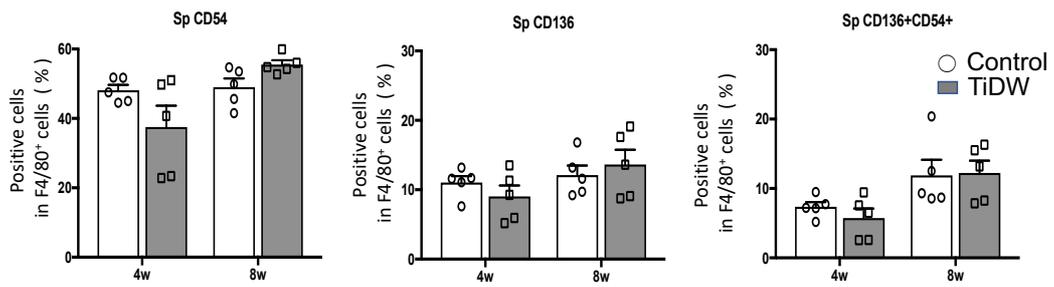


図 6 TiDW吸入暴露後の脾臓マクロファージにおけるCD54及びCD136の発現
吸入暴露後4週、8週における脾細胞におけるマクロファージ中 (F4/80*)の
CD54*、CD136*及びCD54*細胞の割合。
結果 (%)=平均値±SD (n=4~5/group)

図 7

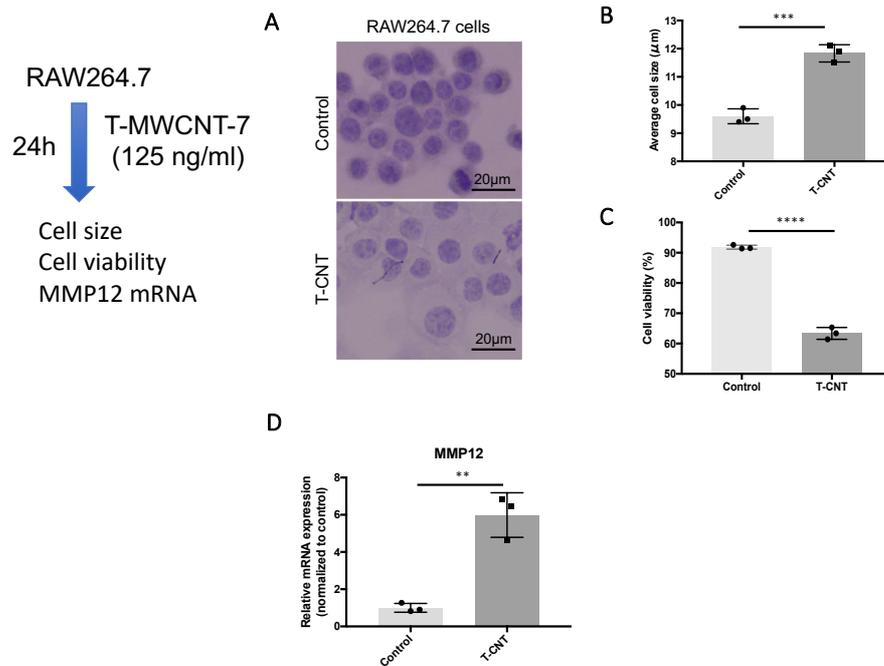


図 7 RAW264.7細胞へのT-CNT曝露による変化

RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収した。

A:トリパンブルー染色処理を施された細胞を顕微鏡にて観察。T-CNT線維が観察される。

B:自動細胞計測装置にて細胞直径を計測した。

結果(µm)=平均値±SD (triplicate), ***p < 0.00005

C:細胞のviabilityをトリパンブルー染色によって自動細胞計測装置で判定した。

結果(%)=平均値±SD (triplicate), ***p < 0.000005

D:MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。

結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), ***p < 0.005

A~Dの結果は同様の実験を3回実施し、再現性を確認している。

図8

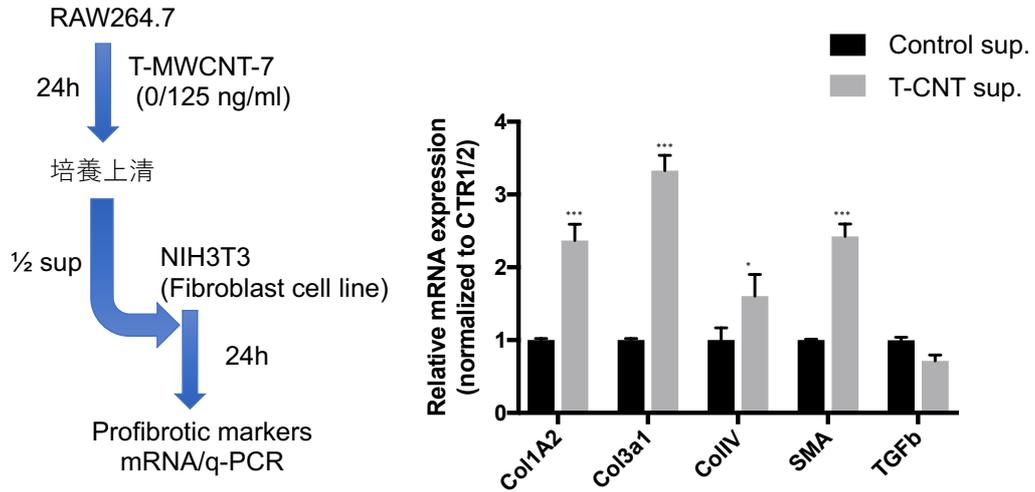


図8 T-CNT刺激RAW264.7細胞の培養上清を用いた線維芽細胞への影響
RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に培養上清をNIH3T3細胞の培養液の1/2相当に添加し24時間後のNIH3T3細胞を回収し、各種遺伝子プライマーを用いてmRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。
結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 同様の実験を3回実施し、再現性を確認している。

図9

THP-1 cell

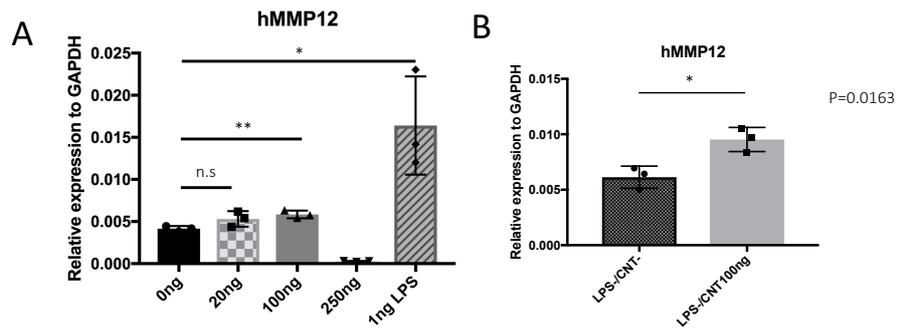


図9 THP-1細胞へのT-CNT曝露の影響

A: THP-1細胞にT-CNT(0~250 ng/ml)あるいはLPS (1 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収し、MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。結果 (GAPDH mRNAに対する相対値)=平均値 ±SD (triplicate), *p < 0.05, **p < 0.005

B:: THP-1細胞にT-CNT(100 ng/ml)およびLPS (1 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収し、MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。対照細胞はLPS刺激のみとした。結果 (GAPDH mRNAに対する相対値)=平均値 ±SD (triplicate), *p < 0.05