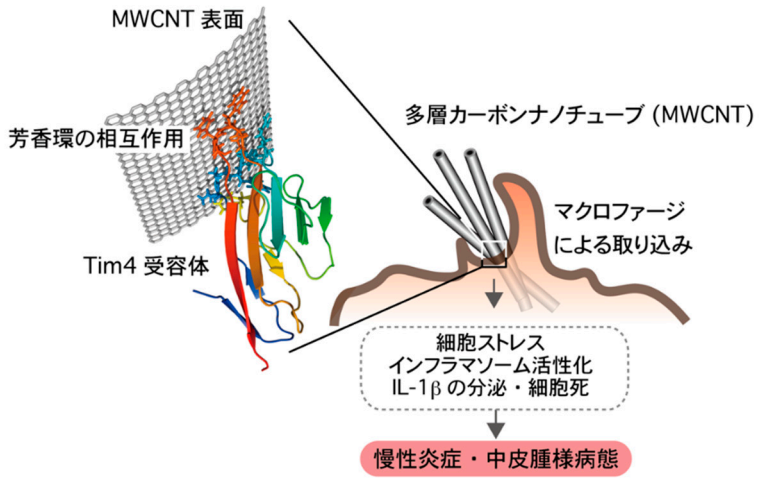
15　環境微粒子による慢性炎症疾患の分子機構の解明	中山　勝文

【目的】PM2.5 や排出ガスといった大気汚染物質の曝露による健康被害は国際的な社会問題となっているが、その詳細な機序は良く判っていない。環境微粒子の主成分はシリカ（二酸化珪素）および炭素であるが、それが生体内に入るとマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれる。最近の国内外の研究から一部の結晶粒子を貪食したマクロファージでは炎症性細胞死（パイロトーシス）と NLRP3 インフラマソームの活性化が起きることが判ってきた。しかしながら、なぜマクロファージが細胞表面上で結晶粒子をこれほど効率よく認識するのか未だによく判っていない。我々はこれまでにシリカ受容体としてクラス B スカベンジャー受容体 SR-B1 を同定してきたが、SR-B1 は炭素微粒子を認識しないことも判明した。そこで本研究ではマクロファージによる炭素微粒子の認識機構を解析した。

【方法】炭素微粒子を認識する受容体の探索として、マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 に種々のマクロファージ受容体の遺伝子を導入し、カーボンブラックナノ粒子（CBNP）あるいは多層カーボンナノチューブ（MWCNT）との結合能をフローサイトメトリー（FACS）による側方散乱光強度解析により測定した。マクロファージ細胞レベルでの MWCNT 毒性評価として、C57BL/6 マウス腹腔マクロファージによる炭素微粒子の認識能および IL-1β 分泌をそれぞれ FACS および ELISA で測定した。マウス個体レベルでの MWCNT 毒性評価として、C57BL/6 マウス腹腔内に MWCNT を投与し、その 7 日後の横隔膜腹腔側中皮細胞層の肉芽腫病態を観察した。同定した炭素微粒子受容体 T cell mucin immunoglobulin（Tim）4 の機能解析には、抗マウス Tim4 中和モノクローナル抗体 RMT4-54 を用いた。

【結果】スカベンジャー受容体、C 型レクチン、Fc 受容体、補体受容体、ホスファチジルセリン（PS）受容体といったマウスマクロファージ受容体の炭素微粒子（球状構造を示す CBNP と針状構造を示す MWCNT）の認識能を解析した結果、とりわけ PS 受容体の Tim4 がいずれの炭素微粒子も効率良く認識することが判明した。さらに Tim4 変異体を用いた解析から、Tim4 の細胞外領域 IgV ドメインに存在する芳香属アミノ酸クラスターが炭素微粒子との結合に必須であることが判明した。その一方で Tim4 は炭素を含まないアスベストは認識しなかった。これらの結果は、Tim4 は炭素微粒子受容体として機能し、その認識様式は、PS 認識様式とは異なり π-π 相互作用が重要であることを示唆する。RMT4-54 を用いた *in vitro* および *in vivo* 実験から、C57BL/6 マウス腹腔マクロファージは Tim4 を介して MWCNT を貪食し、リソソーム障害を介して IL-1β の分泌を誘導し、その結果、横隔膜の腹腔側の中皮細胞層に肉芽腫形成を起こすことが判明した。一方、CBNP も Tim4 を介してマクロファージに貪食されるが、リソソーム障害が起きないため炎症を惹起しないことが判明した。これらの結果は、マクロファージは Tim4 を介して炭素微粒子を貪食するが、その炎症応答は炭素微粒子の形状に起因することを示唆する。

Tim4 を介するマクロファージの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）取り込み機構



15. 環境微粒子による慢性炎症疾患の分子機構の解明

中山　勝文

立命館大学 薬学部 免疫微生物学研究室

Key words：炭素微粒子，マクロファージ，貪食，炎症

緒　言

PM2.5 や排出ガスといった大気汚染物質の曝露による健康被害は国際的に大きな社会問題となっている。最近の大規模疫学調査から、これらの曝露レベルと呼吸器系および循環系慢性炎症疾患の発症率との間に正の相関が認められること［1］から、環境微粒子は慢性炎症の惹起あるいは増悪に関与すると考えられる。その健康被害の機序としてこれまで環境微粒子に付着したエンドトキシンや多様な化学物質に焦点を当てて研究されてきたが、付着物では慢性炎症の病態を説明することができない。そこで微粒子本体が生体に及ぼす影響を理解する必要がある。

生体内に入った微粒子は主にマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれることが古くから知られている。最近の国内外の研究から様々な結晶粒子（コレステロール結晶、尿酸塩結晶、シリカ、アスベストなど）を貪食したマクロファージでは炎症性細胞死（パイロトーシス）と NLRP3 インフラマソームの活性化が起きることが判ってきた［2］。さらにこれら粒子は生分解性が極めて低いために持続的にマクロファージを活性化し続け、その結果、慢性炎症や癌化を引き起こすと考えられる［2］。しかしながら、なぜマクロファージが結晶粒子をこれほど効率よく認識するのか未だによく判っていない。

我々はこれまでにマクロファージによる結晶粒子認識機構を解明する一環として、マクロファージ cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法によりシリカ（二酸化珪素）受容体としてクラス B スカベンジャー受容体 SR-B1 を同定してきた［3］。SR-B1 によるシリカ認識は電荷依存的であるが、シリカと同様に生体内で陰性に帯電する尿酸塩結晶、アスベスト、炭素微粒子といった他の結晶粒子は SR-B1 非依存的にマクロファージに取り込まれることも判明した［3］。この結果は、マクロファージは多様な受容体を介して構造の異なる結晶粒子を識別していることを示唆する［4］。環境微粒子の主な主成分はシリカと炭素であるため、次に我々はマクロファージによる炭素微粒子の認識機構について解析を進めた。炭素微粒子の中でもとりわけその有用性と毒性が大きな議論となっているカーボンナノチューブ（CNT）［5］に焦点を当て、そのマクロファージ認識機構について解析を行った［6］。

方　法

1.　炭素微粒子の物性解析

カーボンブラックナノ粒子（CBNP：#80、旭カーボン）および多層カーボンナノチューブ（MWCNT：#659258、シグマアルドリッチ）の一次粒子径は電子顕微鏡解析により測定し、二次粒子径は動的光散乱解析により測定した。各微粒子中の含有金属量は ICP-MS により測定した。

2.　CNT と結合するマクロファージ受容体の探索

マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 にマクロファージ受容体の遺伝子を導入し、MWCNT との結合能をフローサイトメトリー（FACS）による側方散乱光強度解析により測定した。具体的に遺伝子導入したマクロファージ受容体は、Scavenger receptor-A1（SR-A1：別名 MSR）、Scavenger receptor-A6（SR-A6：別名 MARCO）、SR-B1、SR-B2（別名 CD36）、C-type lectin receptor 4e（Clec4e：別名 Mincle）、Clec9a（別名 DNGR-1）、Clec12a（別名 MICL）、Fcγ RI（別名 CD64）、Fcγ RIII（別名 CD16）、Complement Receptor3（CR3）、C5aR、T cell mucin immunologlobulin

（Tim）3、Tim4 であり、各々のタンパクレベルでの発現を FACS により確認した。

3. *In vitro* 炎症応答解析

C57BL/6 マウス腹腔マクロファージを LPS（3 ng/ml）でプライミングした後、CBNP あるいは MWCNT（10 or 30 μg/ml）で刺激し、3 時間後の IL-1β分泌量を ELISA にて測定した。なお Tim4 の関与を調べるために抗マウス Tim4 中和モノクローナル抗体（RMT4-54）およびそのアイソタイプコントロール抗体 control rat IgG2a/κ（cIg）を用いた。

4. *In vivo* 炎症応答解析

CBNP あるいは MWCNT（30 μg/mouse）を C57BL/6 マウス腹腔内に投与し、1 週間後の中皮細胞層の肉芽種形成についてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色による病理解析を行った。なお Tim4 の関与を調べるために RMT4-54 および cIg を用いた。

結　果

1. 炭素微粒子の物性解析

電子顕微鏡解析により CBNP は球状を示し、一次粒子径は 28±5.0 nm であることが判明した。一方 MWCNT はアスベストに似た針状構造を示し、一次粒子径は 132±47 nm×5.1±2.4 mm（D×L）であった。いずれの炭素微粒子も水溶液中では数 10～数 100 μm のサイズに凝集した。これら炭素微粒子に含まれる Fe、Cu、V、Ni、Zn、Co の含有量に顕著な差は認められなかった。CBNP あるいは MWCNT をマクロファージに添加すると、いずれも効率良く貪食されたが、CBNP を貪食したマクロファージは炎症応答を示さない一方で、MWCNT を貪食したマクロファージでは細胞死が誘導され、同時に IL-1β が顕著に分泌された。以上の結果は、CBNP は炎症を起こさないが MWCNT は強い炎症を引き起こす炭素微粒子であることを示唆する。

2. 炭素微粒子受容体の探索

マクロファージは炭素微粒子を貪食するが、NIH-3T3 細胞は炭素微粒子を認識しない。この結果は、炭素微粒子を認識する受容体はマクロファージに発現するが NIH-3T3 には発現しないことを示唆する。そこで NIH-3T3 にスカベンジャー受容体、C 型レクチン、Fc 受容体、補体受容体、ホスファチジルセリン（PS）受容体といった種々のマクロファージ受容体を導入し、炭素微粒子の認識能を FACS により解析した。その結果、とりわけ PS 受容体の Tim4 を発現させた NIH-3T3 が CNBP および MWCNT のいずれに対しても顕著な認識能を獲得することが判明した。さらに変異型 Tim4 タンパク質を用いた炭素微粒子結合実験から、Tim4 の細胞外領域の IgV ドメインに存在する芳香属アミノ酸クラスターが炭素微粒子との結合に必須であることが判明した。また Tim4 は炭素を含まないアスベストとは結合しないことも判明した。以上の結果は、Tim4 は炭素微粒子受容体として機能し、その認識は PS 認識様式とは異なり、π-π 相互作用が重要であることを示唆する。

3. マクロファージによる Tim4 を介した炭素微粒子認識機構

C57BL/6 マウス腹腔マクロファージは効率良く MWCNT を貪食して IL-1β を分泌したが、このとき抗マウス Tim4 中和モノクローナル抗体をこのマクロファージに前処理することにより MWCNT 貪食能と IL-1β分泌が有意に低下した（図 1A）。この結果は、腹腔マクロファージは Tim4 を介して MWCNT を認識することを示唆する。一方でアスベスト認識については抗マウス Tim4 中和モノクローナル抗体の阻害効果は認められなかった。この結果は、Tim4 がアスベストを認識しない結果と一致する。

4. Tim4 を介する中皮細胞層肉芽腫形成

アスベストに起因する代表的疾患として中皮腫が挙げられるが、マウス気管内投与では中皮腫様病態が観察されないため、そのモデルとしてマウス腹腔内投与による横隔膜中皮細胞層の病理解析が行われる。同様にマウス腹腔内に MWCNT を投与すると中皮腫様病態が観察される［7, 8］。これらの報告に従って C57BL/6 マウス腹腔内に MWCNT（30 μg/mouse）を投与した結果、腹腔内炎症が起き（図 1B～D）、横隔膜の腹腔側の中皮細胞層に肉芽種形成が観察された（図 1E、F）。一方、CBNP の腹腔内投与では腹腔炎が起きなかった。この結果は、マクロファージは CBNP を

貪食しても炎症応答が起きないことと一致する。MWCNT の毒性発現への Tim4 の関与を調べるために抗 Tim4 中和モノクローナル抗体を前処置したマウス腹腔内に MWCNT を投与した結果、腹腔炎および肉芽腫形成ともに軽減された（図 1B～F）。これらの結果は、MWCNT 毒性に Tim4 が関与することを示唆する。

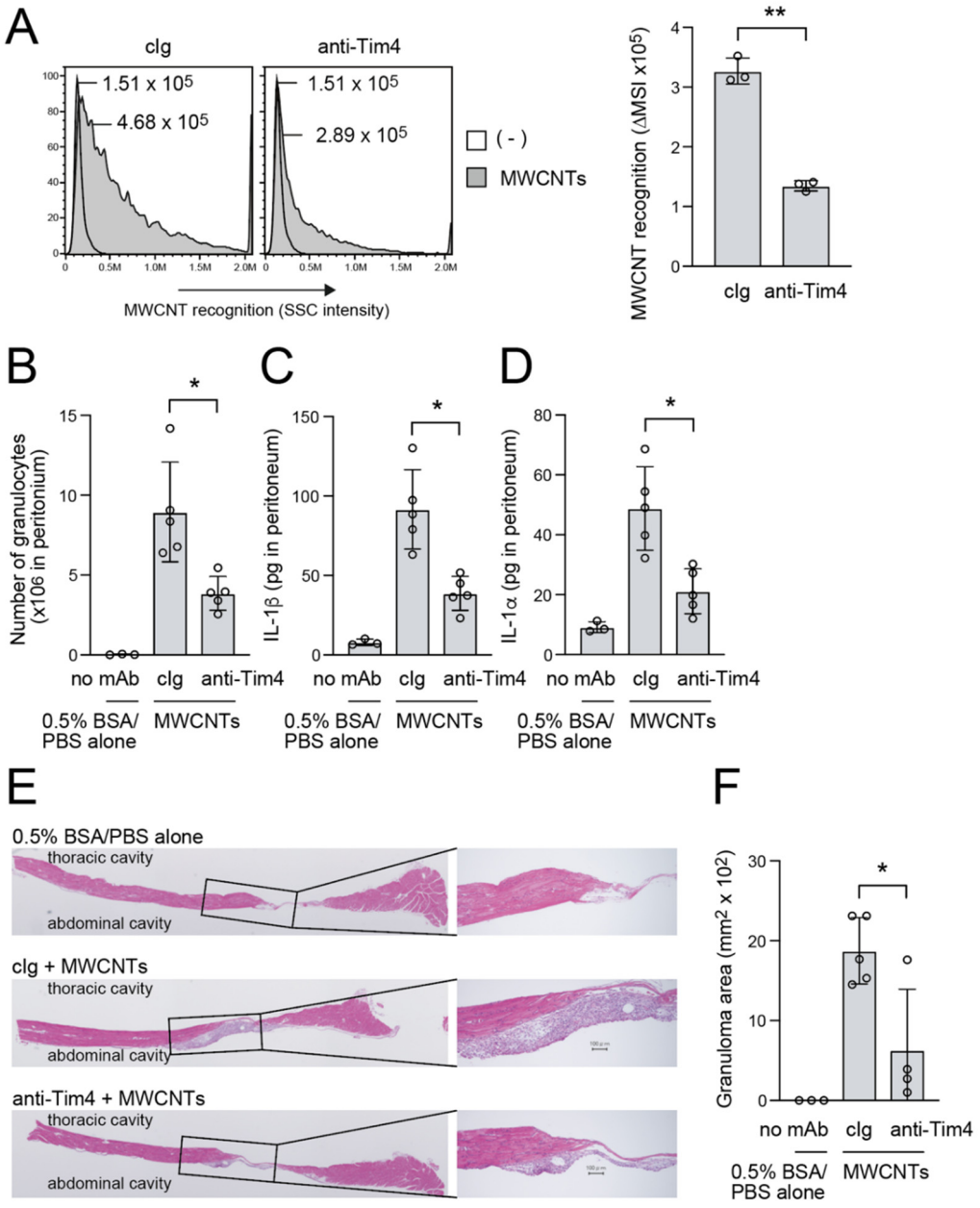


図 1. MWCNT による炎症への Tim4 の関与

A） 抗 Tim4 中和モノクローナル抗体 RMT4-54 あるいはアイソタイプコントロール抗体 cIg を処理した C57BL/6 マウス腹腔マクロファージの MWCNT 認識能を FACS により解析した。

B～D） RMT4-54 あるいは cIg を前投与した C57BL/6 マウス腹腔内に MWCNT（30μg/mouse）を投与し、6 時間後の腹腔内好中球数（B）、IL-1β分泌量（C）、および IL-1α分泌量（D）を FACS および ELISA で測定した。

E、F） RMT4-54 あるいは cIg を前投与した C57BL/6 マウス腹腔内に MWCNT（30μg/mouse）を投与し、7 日後の横隔膜を HE 染色し（E）、その中皮細胞層肉芽腫形成面積を NIHimageJ で測定した（F）。*p＜0.05、**p＜0.01、unpaired 2-tailed t test。

考　察

本研究において Tim4 が炭素微粒子受容体として機能することが判明した。Tim4 はマウス腹腔マクロファージに高発現しており、実際に MWCNT のマウス腹腔内投与による中皮細胞層肉芽腫形成に Tim4 が関与することも明らかとなった。しかしながらヒトでは経気道曝露での毒性を考える必要がある。特筆すべきことに最近の報告［9］から Tim4 がヒト胸腔マクロファージ上に高発現していることが判明し、ヒトにおいても Tim4 が MWCNT の毒性発現に関与する可能性が考えられる。今後、ヒトへの外挿性を踏まえ CNT 毒性の克服に向けて研究を展開していきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院情報科学研究科生命情報システム科学分野の大森聡博士、木下賢吾教授、東北大学多元物質科学研究所ハイブリッド炭素ナノ材料研究分野の千川康人助教（現東海カーボン株式会社）、および順天堂大学大学院医学研究科免疫学講座の秋葉久弥准教授である。

文　献

1） McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. N Engl J Med. 2007;357(23):2348-58. Epub 2007/12/07. doi: 10.1056/NEJMoa071535. PubMed PMID: 18057337.

2） Franklin BS, Mangan MS, Latz E. Crystal Formation in Inflammation. Annu Rev Immunol. 2016;34:173-202. Epub 2016/01/17. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055539. PubMed PMID: 26772211.

3） Tsugita M, Morimoto N, Tashiro M, Kinoshita K, Nakayama M. SR-B1 Is a Silica Receptor that Mediates Canonical Inflammasome Activation. Cell Rep. 2017;18(5):1298-311. Epub 2017/02/02. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.004. PubMed PMID: 28147282.

4） Nakayama M. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. Front Immunol. 2018;9:103. Epub 2018/02/13. doi: 10.3389/fimmu.2018.00103. PubMed PMID: 29434606; PubMed Central PMCID: PMCPMC5796913.

5） Hansen SF, Lennquist A. Carbon nanotubes added to the SIN List as a nanomaterial of Very High Concern. Nat Nanotechnol. 2020;15(1):3-4. Epub 2020/01/12. doi: 10.1038/s41565-019-0613-9. PubMed PMID: 31925393.

6） Omori S, Tsugita M, Hoshikawa Y, Morita M, Ito F, Yamaguchi SI, et al. Tim4 recognizes carbon nanotubes and mediates phagocytosis leading to granuloma formation. Cell Rep. 2021;34(6):108734. Epub 2021/02/11. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108734. PubMed PMID: 33567275.

7） Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Nat Nanotechnol. 2008;3(7):423-8. Epub 2008/07/26. doi: 10.1038/nnano.2008.111. PubMed PMID: 18654567.

8） Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. Cancer Sci. 2012;103(8):1440-4. Epub 2012/04/28. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x. PubMed PMID: 22537085; PubMed Central PMCID: PMCPMC3569866.

9） Chow A, Schad S, Green MD, Hellmann MD, Allaj V, Ceglia N, et al. Tim-4(+) cavity-resident macrophages impair anti-tumor CD8(+) T cell immunity. Cancer Cell. 2021;39(7):973-88 e9. Epub 2021/06/12. doi: 10.1016/j.ccell.2021.05.006. PubMed PMID: 34115989.