

研究終了報告書

「マクロファージによる粒子状物質パターン認識機構の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：中山勝文

1. 研究のねらい

シリカ、アスベスト、カーボンナノチューブ（CNTs）といった粒子状物質は、生体内でそのほとんどがマクロファージに取り込まれ、そのマクロファージのストレス応答が引き金となり慢性炎症・癌化を引き起こす。近年とりわけ CNTs の開発研究と利用が年々急増しており、具体的には電池材料、集積回路、宇宙船体やバイオマテリアル等様々な材料として広く利用されている。その一方でマウスやラットを用いた動物実験から、一部の CNTs がアスベスト様の毒性を示すことが報告された。その毒性発現機序が不明なまま 2019 年に化学専門家組織 ChemSec が CNTs を Substitute It Now List (SIN リスト) に加えたため、今後の CNTs の取り扱いについて世界的に大きな論争が起きている。このことから CNTs がどのように生体に認識されるのかについて、その分子認識機構を解明することが重要である。本研究では、CNTs と結合するマクロファージ細胞表面分子を同定し、そのパターン認識機構および慢性炎症の病態を解明することを目標とし、免疫細胞学に材料工学および情報科学を取り入れた学際研究を遂行する。

2. 研究成果

(1) 概要

多層カーボンナノチューブ（MWCNTs）は生体に入るとマクロファージなどの貪食細胞に認識され細胞内に取り込まれる。そのマクロファージでは NLRP3 インフラサソームの活性化が起き、続けて炎症性サイトカインの IL-1beta の分泌と細胞死が起きることにより慢性炎症病態が進行すると考えられる。しかしながらマクロファージ細胞表面上でどのように MWCNTs が認識されるのは不明である。我々は、マクロファ

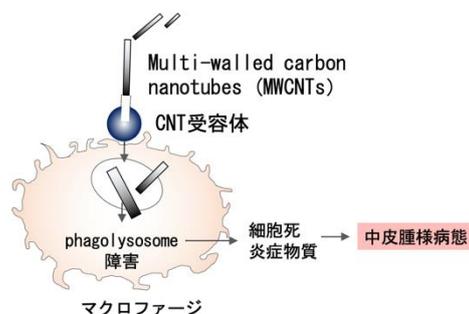


図1. マクロファージによるMWCNTの取り込みと炎症病態

ージ受容体の機能的スクリーニングにより CNT 受容体（CNTR）を同定した。分子動力学シミュレーションにより CNTR の細胞外領域に存在する芳香族アミノ酸クラスターと CNT 芳香環の間で安定した相互作用が認められた。さらに CRISPR/Cas9 システムにより CNTR 遺伝子欠損マウスを作製し、そのマウスでは MWCNTs の認識能が低下し、CNTs による中皮細胞肉芽腫形成が軽減されていることが明らかとなった。以上のマウスモデル実験の結果は、CNTR が MWCNTs による毒性発現に重要な役割を担っていることを示唆する。

(2) 詳細

研究テーマ「CNTR の同定および CNT 認識機構の解析」

種々の貪食受容体をレトロウイルスシステムによりマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞に導入し、個々の MWCNT 認識能について FACS にて解析することにより CNTR を同定した (図 2A)。その認識様式について分子動力学シミュレーション解析した結果、CNTR の細胞外ループドメインの芳香族アミノ酸クラスターが MWCNTs と相互作用し、100 ns に渡り、安定した複合体構造を形成した (図 2B)。実際に、その芳香族アミノ酸クラスターをアラニンに置換した CNTR 変異体を作成して結合実験を行った結果、その変異体は MWCNTs と全く結合しなかった。以上の結果は、CNTR はその細胞外領域ループ上の芳香族アミノ酸クラスターを介して MWCNTs を認識することを示唆する。

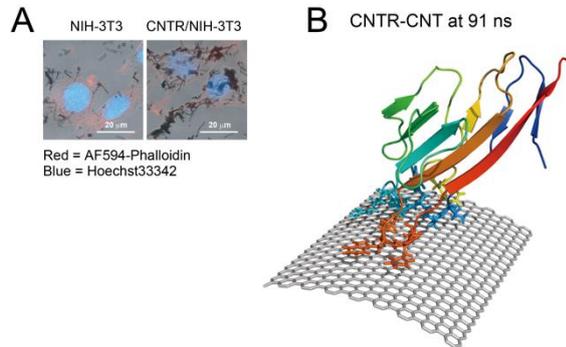


図 2. CNT 受容体による CNT 認識 (A) NIH-3T3 細胞および CNTR/NIH-3T3 細胞に MWCNT を加え、それら細胞による CNT 認識能を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。(B) CNTR と CNT の結合様式を分子動力学シミュレーションにより予測した。

研究テーマ「CNTR 欠損マクロファージの機能解析」

野生型 B6 マウスマクロファージおよび CNTR KO マウスマクロファージの微粒子認識能を FACS および共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果、CNTR KO マウスマクロファージでは MWCNT 認識能が有意に低下していた (図 3A, B, C)。これらマクロファージからの炎症性サイトカイン分泌量を ELISA により測定した結果、CNTR KO マウスマクロファージでは MWCNTs を貪食して分泌される IL-1beta 量が野生型マクロファージよりも有意に低下していた。一方、クリソタイル認識およびその結果起きる IL-1beta 分泌については野生型マクロファージと CNTR KO マクロファージの間に有意差は認められなかった。これは CNTR 発現細胞がクリソタイルを認識しなかった実験結果 (記載なし) と一致する。以上の結果は、CNTR はマウスマクロファージによる MWCNT 認識とその結果起きる

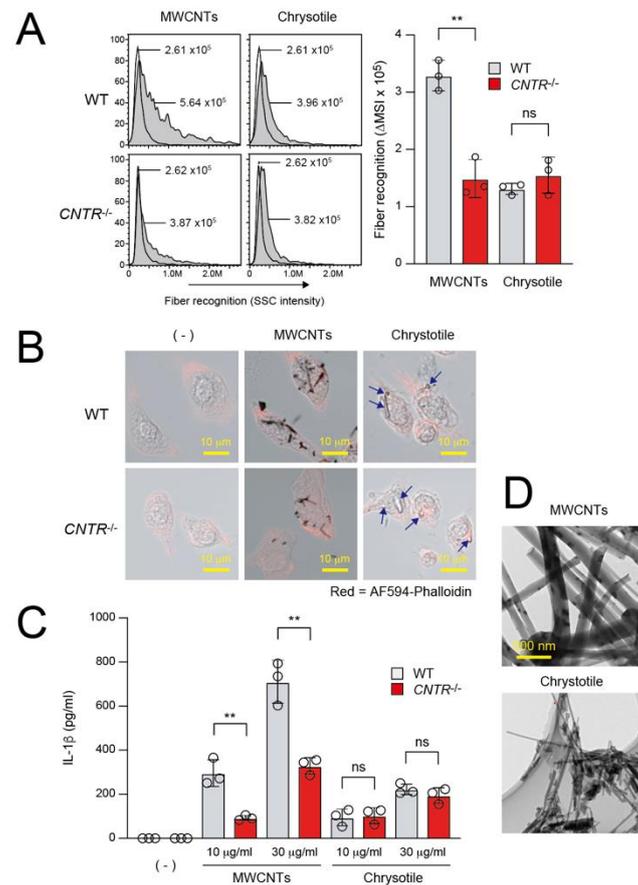


図 3. CNTR 遺伝子欠損マウスマクロファージによる MWCNTs の認識 (A, B, C) 野生型 B6 マウスマクロファージおよび CNTR KO マウスマクロファージによる MWCNTs およびクリソタイルの認識能を FACS および顕微鏡にて観察した。(C) これらマクロファージからの IL-1beta 分泌量を ELISA にて測定した。(D) 実験に用いた微粒子形態を電子顕微鏡観察した。

IL-1beta 分泌に重要な役割を担っていることを示唆する。

研究テーマ「MWCNT による中皮細胞肉芽腫形成モデルマウスの解析」

ヒトにおいてアスベスト曝露 20~30 年後に中皮腫が発生することがよく知られている。しかしながらアスベスト吸入曝露モデルマウスにおいてはその病態が認められないため、マウス実験においてアスベストの中皮への作用を理解するためには、アスベストを腹腔内投与して横隔膜中皮細胞の病理像を解析せざるを得ない。このことから本実験ではマウス腹腔内に MWCNTs を投与して、横隔膜中皮細胞の肉芽腫形成を観察した。野生型 B6 マウスでは MWCNTs 投与により、著しい肉芽腫形成が認められたが、CNTR KO マウスではその病態が軽減されていた(図 4)。野生型 B6 マウスにおいて、クリソタイル投与では MWCNTs 投与に比べて、炎症レベルが低かったが、これは使用したクリソタイルの粒子長が極めて短かったこと(図 3D)に起因すると考えられる。それでも野生型マウスと CNTR KO マウスとの間に MWCNTs 投与による肉芽腫形成に有意差は認められなかった(図 4)。以上の結果は、MWCNTs によるマウス中皮細胞肉芽腫形成に CNTR が関与することを示唆する。

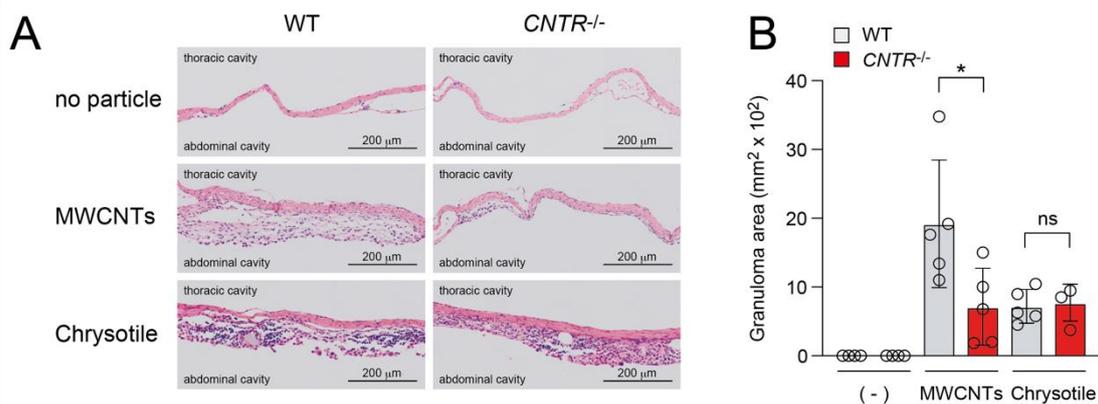


図 4. MWCNTs による中皮細胞肉芽腫形成 (A) 野生型 B6 マウスおよび CNTR KO マウス腹腔内に MWCNTs あるいはクリソタイルを投与し、1 週間後の横隔膜中皮細胞を H&E 染色した。(B) A の肉芽腫形成面積を測定し、数値化した。

3. 今後の展開

本研究により我々は CNT 受容体を同定し、マウスモデル実験により MWCNTs の毒性発現に CNT 受容体が関与することを明らかにした。CNTs は現在広く使用されている一方で、ヒトでの安全性が懸念されている。実際に米国において CNTs を扱う工場の複数の作業員に肺疾患が認められており、ChemSec は CNTs を SIN リストに加えたことから、今後 CNTs をどう扱っていくべきか世界中で大きな議論が繰り広げられている。そのため CNTs の毒性発現機序を正しく理解することが極めて重要である。本研究成果から、ヒトでの CNTs の毒性発現に CNTR 受容体が関与しているのか解析することが今後の課題である。

4. 自己評価

本研究にて、さきがけ領域内外の多くの研究グループと学際研究することにより、MWCNTs

のマウス生体認識分子機構を明らかにした(論文リバイス中)。研究期間内に論文発表に至らなかったが、概ね順調に進んだと評価する。ヒトにおけるCNTの安全性評価は現在ナノテクノロジー産業界において最も重要な課題の一つであり、本研究成果で明らかとなったCNT受容体がヒトでのCNT認識および毒性発現に関与しているか今後の課題である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文発表

研究期間累積件数: 2件

1. Nakayama, M. Macrophage recognition of crystals and nanoparticles. *Front. Immunol.* 2018, 9, 103

Inhalation of exogenous crystals such as silica, asbestos, and carbon nanotubes can cause lung fibrosis and cancer. Endogenous crystals such as monosodium urate and cholesterol are associated with pathogenesis of gout and atherosclerosis, respectively. These crystal-associated inflammatory diseases are triggered by the macrophage NLRP3 inflammasome activation and cell death. Therefore, it is important to understand how macrophages recognize crystals. However, it is unlikely that macrophages have evolutionally acquired receptors specific for crystals or recently emerged nanoparticles. Several recent studies have reported that some crystal particles are negatively charged and are recognized by scavenger receptor family members in a charge-dependent manner. Alternatively, a model for receptor-independent phagocytosis of crystals has also been proposed. This review focuses on the mechanisms by which macrophages recognize crystals and nanoparticles.

2. Omori S, Tsugita M, Hoshikawa Y, Morita M, Yamaguchi S-I, Xie Q, Noyori O, Yamaguchi T, Takada A, Saitoh T, Akiba H, Nagata S, Kinoshita K, and Nakayama M. Tim4 recognizes carbon nanotubes and mediates frustrated phagocytosis leading to granuloma formation. *Cell Press Sneak Peek*. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=36314040

Frustrated phagocytosis is critical for crystal-associated fibrosis and cancer. Of note, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), the highly representative products of nanotechnology, induce macrophage NLRP3 inflammasome activation and cause asbestosis-like pathogenesis. However, it remains largely unknown how macrophages efficiently recognize MWCNTs on their cell surfaces. Here we identify by a targeted screening of phagocyte receptors the phosphatidylserine receptors T-cell immunoglobulin mucin 4 (Tim4) and Tim1 as the pattern-recognition receptors for carbon crystals. Docking simulation studies revealed spatiotemporally stable interfaces between aromatic residues in the extracellular IgV domain of Tim4 and one-dimensional carbon crystals. Further, CRISPR/Cas9-mediated deletion of Tim4 and Tim1 revealed that Tim4, but not Tim1, critically contributed to recognition of MWCNTs by peritoneal macrophages and to granuloma development in a mouse model of direct mesothelium exposure to MWCNTs. These results suggest that Tim4 recognizes MWCNTs through aromatic interactions and mediates frustrated phagocytosis leading to granulomas.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 中山勝文 マクロファージによる微粒子の認識機構 第 138 回日本薬学会年会(幕張)
2018 年 3 月 22 日
2. 中山勝文 マクロファージによる無機粒子の認識機構 第 46 回日本毒性学会学術年会
(徳島) 2019 年 6 月 27 日
3. 中山勝文 結晶微粒子が引き起こすマクロファージ活性化と疾患 第 19 回関西バイオ創
薬研究会(大阪) 2020 年 1 月 31 日