

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02960

研究課題名(和文) 微小粒子状化学物質に対する生体応答分子機構の解明

研究課題名(英文) Inflammatory responses to crystals and nanoparticles

研究代表者

中山 勝文(Nakayama, Masafumi)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・客員准教授

研究者番号：20453582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：シリカ(二酸化ケイ素)は地殻の6割を占める地球上で最も多い化合物の一つであり、その粉塵微小粒子を大量に吸い込むと数年に渡って肺の慢性的な炎症が起き、塵肺と呼ばれる重篤な肺疾患が発症する。その炎症機構として、体内でマクロファージがシリカを貪食し細胞死が起きることが引き金となることが考えられている。しかしながら、どのようにマクロファージがシリカ粒子を取り込むのかは不明であった。本研究では、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、クラスBスカベンジャー受容体のSR-B1を新規シリカ受容体として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塵肺などの慢性炎症による線維化が起きる病態については未だに不明な点が多く残されており、効果的な治療法もない。本研究結果から、塵肺が起きる初期において、マクロファージがSR-B1を使ってシリカ粒子を認識し、それを細胞内に取り込むことによって炎症を惹起する可能性があることが示唆された。本研究をさらに発展させることにより、粉塵微小粒子が引き起こす炎症性疾患の病態が解明されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The inhalation of silica dust is associated with fibrosis and lung cancer, which are triggered by macrophage inflammatory responses; however, how macrophages recognize silica remains largely unknown. Here we identify by functional expression cloning the class B scavenger receptor SR-B1 as a silica receptor. Genetic deletion of SR-B1 and masking of SR-B1 by monoclonal antibodies showed that SR-B1-mediated recognition of silica is associated with caspase-1-mediated inflammatory responses in mouse macrophages and human peripheral blood monocytes. Furthermore, SR-B1 was involved in silica-induced pulmonary inflammation in mice. These results indicate that SR-B1 is a silica receptor associated with canonical inflammasome activation.

研究分野：衛生化学・免疫学

キーワード：マクロファージ シリカ 粉塵 ナノ粒子 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シリカ(二酸化ケイ素 SiO_2)は、地球上で最も多い化合物の一つであり、岩や砂の主成分である。そのためシリカはPM2.5(粒子径 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の大気中粒子状物質の総称)や多くの粉塵に含まれる。シリカにはSiとOが規則性を持って配列する結晶(クリスタル)とその規則性がない非晶質(アモルファス)が存在する。結晶シリカで肺胞まで到達するような微粒子は毒性が高く、その粉塵を大量に吸い込むと珪肺と呼ばれる重篤な肺疾患を引き起こすことは良く知られている。また多くの疫学研究から、シリカ粉塵の曝露レベルと肺癌、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、リウマチ等の疾患の発症との間に正の相関が認められている。

結晶シリカとは異なり非晶質シリカは概ね安全であり、乾燥剤や賦形剤として多くの食品や医薬品に含まれている。しかし最近の動物実験から、非晶質でも粒子径が 100 nm 以下のナノ粒子については急性炎症を引き起こす可能性が指摘されている。近年のナノテクノロジーの発展により多種多様なナノマテリアルが製造されており、その中で非晶質シリカナノ粒子は二酸化チタン TiO_2 ナノ粒子と並んで世界的に最も生産量が多いため、ヒトへの安全性評価が今後の課題とされる。

シリカ微粒子が肺胞に到達すると肺胞マクロファージに効率良く貪食される。そのマクロファージの炎症応答が肺疾患の発症に深く関わっていると考えられる。したがって、その病態を理解する上で、マクロファージによるシリカ微粒子の認識機構を明らかにすることは重要であるが、その機構はよく判っていない。

2. 研究の目的

マクロファージによるシリカ微粒子の認識機構を明らかにし、モデルマウスを用いて珪肺の病態を理解する。

3. 研究の方法

3-1) シリカ受容体の探索

マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM) 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受容体を探索した。具体的には、レトロウイルスのBMDM cDNA ライブラリーをマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞に導入したのち、FITC 標識シリカナノ粒子への結合能を獲得した細胞をセルソーターおよび限界希釈法により単離した。次にその細胞のゲノムに組み込まれたライブラリー由来遺伝子をシーケンサーにより解析した。

3-2) 抗マウスおよび抗ヒト SR-B1 中和モノクローナル抗体の樹立

マウス SR-B1 発現細胞およびヒト SR-B1 発現細胞を各々SD ラットおよび BALB/c マウスに免疫し、得られた所属リンパ節からハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマのスクリーニングは FITC-シリカナノ粒子と SR-B1 の結合の阻害活性を指標に行った。

3-3) *in vitro* 炎症実験

野生型 BMDMs および SR-B1 遺伝子欠損マウス由来 BMDMs のシリカに対する炎症応答について解析した。具体的には、IL-1 β 分泌、細胞死、およびインフラマソーム活性を各々ELISA、LDH 遊離試験、およびイムノプロットにより解析した。

3-4) *in vivo* 炎症実験

急性肺炎モデルとして、C57BL/6 マウス気管内に結晶シリカ粒子を投与し、24 時間後の肺病理像についてマイクロ CT (LeThetaTM LCT-200, Hitachi) により評価した。また慢性肺炎モデルとしては、シリカ投与 1 ヶ月後の肺線維化をシリウスレッド染色により評価した。

4. 研究成果

BMDM cDNA ライブラリーを用いてシリカ粒子に結合能を示す受容体をスクリーニングした結果、SR-B1 遺伝子を単離した。実際に SR-B1 遺伝子をマウスリンフォーマ細胞株 BW5147 などに導入するとシリカ粒子結合能を獲得した(図1)。興味深いことに SR-B1 は結晶および非晶質の両シリカ粒子に結合したが、アスベスト、尿酸塩結晶、TiO₂ ナノ粒子等には結合しなかった。この結果から、SR-B1 は少なくとも今回調べた粒子状物質の中ではシリカ特異的に結合することが示唆された。

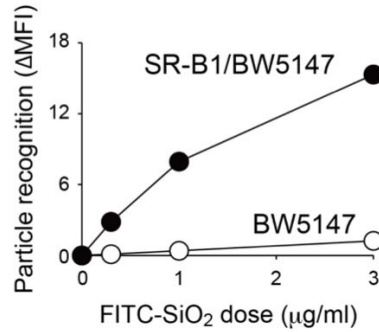


図1. SR-B1を発現させた細胞株はシリカ粒子への結合能を獲得する。

次に我々は、マクロファージのシリカ認識における SR-B1 の関与について SR-B1 遺伝子欠損マウス由来 BMDMs を用いて調べた結果、その欠損 BMDMs は野生型に比べて結晶および非晶質の両シリカ粒子の有意な認識能の低下が認められた。またそれに続く NLRP3 インフラマソームの Caspase-1 活性化および IL-1β分泌の低下も認められた。

最後に我々は、シリカ投与による急性間質性肺炎マウスモデルを用いて、その炎症病態における SR-B1 の関与を検討した。SR-B1 は HDL 受容体として機能するため、SR-B1 遺伝子欠損マウスではコレステロールおよびグルココルチコイドの合成レベルが低下しており、シリカによる炎症に対する SR-B1 の関与が正しく理解できない。そのため我々は新たに樹立した抗 SR-B1 中和モノクローナル抗体を用いて解析した。その結果、シリカ投与 24 時間後における急性肺炎およびシリカ投与 1 ヶ月後における肺線維化は、ともに抗 SR-B1 中和モノクローナル抗体によって部分的に抑制された(図2)。一方、その抗体は酸化チタンナノ粒子による肺炎に対しては効果がなかった。以上の結果から、SR-B1 はシリカ受容体として機能し、シリカ曝露により起きる炎症病態に関与することを示唆する。

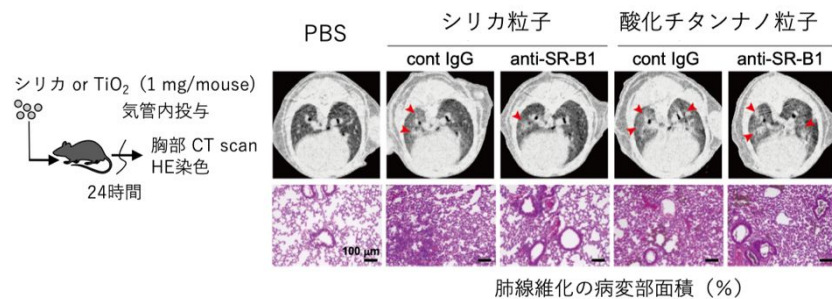


図2. 抗SR-B1抗体は珪肺の病態進行を遅らせる

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)計7件)

1. [Nakayama M.](#) Macrophage recognition of crystals and nanoparticles. *Front. Immunol.* Vol. 3, 103, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00103. (査読有)
2. [Morimoto N](#), [Takei R](#), [Wakamura M](#), [Oishi Y](#), [Nakayama M](#), [Suzuki M](#), [Yamamoto M](#), and [Winnik FM](#). Fast and effective mitochondrial delivery of omega-Rhodamine-B-polysulfobetaine-PEG copolymers. *Sci. Rep.*, Vol. 8, 1128, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-19598-2. (査読有)
3. [Isshiki T](#), [Akiba H](#), [Nakayama M](#), [Harada N](#), [Okumura K](#), [Homma S](#), and [Miyake S](#). Cutting Edge: Anti-TIM-3 treatment exacerbate pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Immunol.* Vol. 199, 3733-3737, 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1700059. (査読有)
4. [Funamoto K](#), [Yoshino D](#), [Matubara K](#), [Zervantonakis IK](#), [Funamoto K](#), [Nakayama M](#), [Masamune J](#), [Kimura Y](#), and [Kamm RD](#). Endothelial monolayer permeability under

controlled oxygen tension. *Inter. Biol. (Camb.)*, Vol. 19, 529-538, 2017. doi: 10.1039/c7ib00068e. (査読有)

5. Tsugita M, Morimoto N, and Nakayama M. SiO₂ and TiO₂ nanoparticles synergistically trigger macrophage inflammatory responses. *Part. Fibre Toxicol.* Vol. 14, 11, 2017. doi: 10.1186/s12989-017-0192-6. (査読有)
6. Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, Ogasawara K, Okumura K, Thomas DM, and Smyth MJ. IFN-gamma is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat. Commun.* Vol. 8, 14607, 2017. doi: 10.1038/ncomms14607. (査読有)
7. Tsugita M, Morimoto N, Tashiro M, Kinoshita K, and Nakayama M. SR-B1 is a silica receptor that mediates canonical inflammasome activation. *Cell Rep.*, Vol. 18, 1298-1311, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.004. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

1. 中山勝文「マクロファージによる微粒子の認識機構」日本薬学会第139年会 2019年3月 幕張
2. 中山勝文 「マクロファージによるシリカ粒子認識機構」第25回 日本毒性学会学術年会 2018年9月18日 つくば
3. Nakayama M 「Recognition of nanoparticles and crystals by scavenger receptors」 11th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium Jan, 2018 at Osaka
4. Nakayama M 「Identification of a silica receptor associate with canonical inflammasome activation」The 46th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology Dec, 2017 at Sendai
5. 中山勝文 「微小粒子に対する免疫応答機構」第260回 静岡県立大学 月例薬学セミナー - 2017年8月 静岡

〔図書〕(計1件)

1. 中山勝文 第11章「CD8陽性エフェクターT細胞の分化と機能」翻訳 分子細胞免疫学(原著第9版)中尾篤人監訳 エルゼビアジャパン 2018年3月発行

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学プレスリリース 2017年2月8日

「免疫細胞がシリカ粒子を認識する機構を発見 シリカ粉じん暴露による肺炎発症機構の一端を解明」<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/02/press20170208-04.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森本 展行

ローマ字氏名：Morimoto Nobuyuki

所属研究機関名：東北大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00313263

研究分担者氏名：船本 健一

ローマ字氏名：Funamoto Kenichi

所属研究機関名：東北大学
部局名：学際科学フロンティア研究所
職名：准教授
研究者番号(8桁): 70451630

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木下 賢吾
ローマ字氏名：Kinoshita Kengo
所属研究機関名：東北大学
部局名：情報科学研究科
職名：教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。