様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ２２ 日現在

機関番号： １１３０１
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2012～2014
課題番号： ２４５９０１５８

研究課題名（和文） マクロファージによるシリカ粒子貪食および炎症誘導機構の解析

研究課題名（英文） Macrophage inflammatory responses to amorphous silica particles

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・准教授

研究者番号：２０４５３５８２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、シリカ粒子の免疫毒性を解明する一環として、シリカ粒子の粒子径がマウス免疫系に与える影響について解析した。C57BL/6マウス骨髄由来マクロファージは粒子径30 nm～1000 nmのシリカ粒子に対して極めて強い炎症応答（インフラマソーム活性化、炎症性細胞死、IL-1beta産生）を示した。それに相関してシリカ粒子気管内投与による急性肺炎モデルマウスにおいて30 nmは極めて激しい肺炎を引き起した。以上の結果は、ナノおよびサブミクロンシリカ粒子は起炎性が高く、それはマクロファージのインフラマソーム活性および細胞傷害誘導作用に依存することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Although amorphous silica particles are used in a wide variety of products such as pharmaceuticals and foods, the immunotoxicity of these particles is not fully understood. In this study, we addressed the relationship between the size of amorphous silica and the inflammatory activity. Of note, 30 nm-1000 nm diameter silica particles induced macrophage lysosomal destabilization, cell death, and IL-1β secretion at markedly higher levels than did 3000 nm-10000 nm silica particles. Consistent with in vitro results, intra-tracheal administration of 30 nm silica particles into mice caused more severe lung inflammation than that of 3000 nm silica particles. Taken together, these results suggest that silica particle size impacts immune responses, with submicron amorphous silica particles inducing higher inflammatory responses than silica particles over 1000 nm in size.

研究分野：　炎症、免疫

キーワード：　シリカ粒子　マクロファージ　炎症　肺炎

１．研究開始当初の背景

シリカ（二酸化珪素 SiO2）結晶粒子は、地殻の約 60%を占める地球上で最も多い化合物の一つであり、その大量暴露により塵肺が発症することはよく知られている。その一方で、結晶構造の異なるアモルファスシリカ粒子は生体適合性が高く安全と考えられているため、多くの食品や医薬品などに含まれている。しかしながら最近の研究から、アモルファスであっても粒子径が小さくなると炎症を引き起こす可能性があることが指摘されている。そのシリカ粒子が引き起す炎症のメカニズムとして、生体内でマクロファージを中心とした貪食細胞に取り込まれ、その貪食細胞が炎症性サイトカインの IL-1βを分泌することが引き金となると考えられている。

IL-1βの分泌には少なくとも二つのシグナルが必要とされる。一つめは LPS などの PAMPs 刺激による IL-1β前駆体の産生である。二つめに NLRP、Pro-caspase-1 などのタンパク複合体（インフラマソーム）により IL-1β前駆体が切断され、成熟 IL-1βが分泌される。シリカ粒子は、マクロファージに取り込まれた後リソソームストレスを介して二つめのシグナル、つまり NLRP3 インフラマソームを活性化することが判っている。しかしながら、マクロファージの細胞表面でのシリカ粒子認識機構は未だに不明であり、またその粒子径の違いで炎症レベルが異なる理由についても全く判っていない。

２．研究の目的

本研究では、工業的にもバイオマテリアルとしても汎用されているアモルファスシリカ粒子に対するマクロファージ応答（貪食、サイトカイン産生、細胞死、および急性肺炎）について、特に粒子径の違いに焦点をあて、マウスモデルを用いて *in vitro* および *in vivo* 解析した。

３．研究の方法

３－１．　*in vitro* 実験

C57BL6 マウス（日本クレア）骨髄由来マクロファージ（BMDMs）に粒子径 30 nm、100 nm、300 nm、1 µm、3 µm、および 10 µm の非晶質シリカ粒子（Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany）を添加し、以下のマクロファージ応答を解析した。LPS（10 ng/ml; List Biological Lab, USA）-primed BMDMs の IL-1β分泌量および細胞死（LDH 遊離）は、それぞれ ELISA キット（eBioscience, USA）および CytoTox96（Promega, WI, USA）により測定した。貪食能は共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss LSM510）により評価した。

３－２．　*in vivo* 実験

C57BL6 マウス気管内シリカ粒子（25mg/kg）投与し、6 時間後および 12 時間後の肺炎についてマイクロ CT（LeThetaTM LCT-200, Hitachi）により評価し、肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量を ELISA kit（eBioscience, USA）にて測定した。

４．研究成果

我々は、はじめに粒子径 30 nm、100 nm、300 nm、1 µm、3 µm、10 µm のアモルファスシリカ粒子について、マクロファージによる取り込み機構について解析した。図１に示すようにマクロファージはいずれのサイズのシリカ粒子も効率良く取り込み、それはアクチン重合阻害剤のサイトカラシン D でほぼ完全に抑制された。この結果は、マクロファージはナノ粒子でもマイクロ粒子と同様に貪食機構により細胞内に取り込むことを示唆する。マクロファージによるシリカ粒子の認識は陰性電荷試薬でほぼ完全に抑制されたことから、シリカ粒子は電荷依存的に取り込まれると考えられるが、既に報告されているスカベンジャー受容体やフォスファチジルセリン受容体の関与は認められなかった。

次に粒子径の違いがマクロファージの IL-1β分泌量に及ぼす影響について、シリカ粒子の重量比、粒子数比、および表面積比から詳細に比較した結果、30 nm～1 µm のシリカ粒子は同程度であり、それらは、3 µm および 10 µm のシリカ粒子に比べて 4 倍程度高

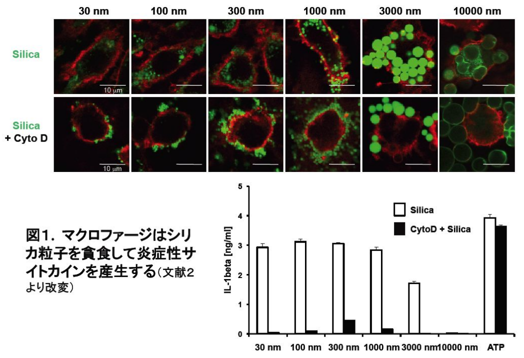

図1. マクロファージはシリカ粒子を貪食して炎症性サイトカインを産生する（文献2より改変）

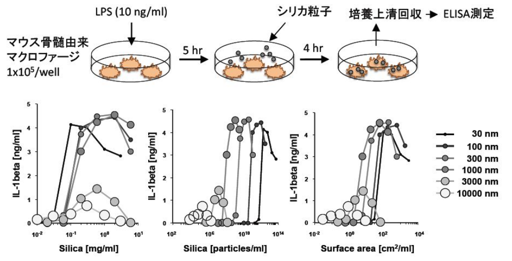

図2. サイズの異なるシリカ粒子に対するマクロファージ炎症応答（文献2より改変）

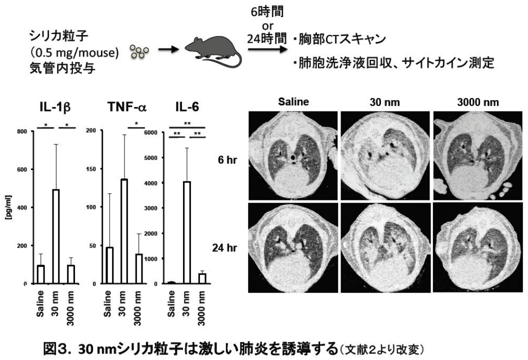

図3. 30 nmシリカ粒子は激しい肺炎を誘導する（文献2より改変）

かった（図２）。この結果と一致して 30 nm ～1 μm のシリカ粒子は顕著なマクロファージリソソーム損傷およびマクロファージ細胞死を誘導した。*in vitro* 実験結果と一致して、30 nm のシリカ粒子は 3 μm のシリカ粒子に比べ重篤なマウス急性肺炎を引き起こすことが判明した（図３）。

本研究により、ナノおよびサブミクロンシリカ粒子は起炎性が高く、それはマクロファージのインフラマソーム活性だけでなく細胞傷害誘導作用に依存することが判明した。この分子メカニズムの解明が今後の課題である。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計８件）
(1) Nakayama M. Antigen presentation by MHC-dressed cells. Front. Immunol. 5, 672, 2015（査読有）

(2) Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. PLoS ONE. e92634, 2014（査読有）

(3) Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K. NKG2D^{+} IFN-g CD8^{+} T cells are responsible for paradium allergy. PLoS ONE. e86810, 2014（査読有）

(4) Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Kametani Y, Suzuki R, Ogasawara K. NKG2D functions as an activating receptor on natural killer cells in the common marmoset (Callithrix jacchus). Int. Immunol. 11, 597-606, 2014（査読有）

(5) Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. NK cell-fratricide: dynamic crosstalk between NK cells and tumor cells. Oncoimmunology. e26529, 2013（査読有）

(6) Yeung M, McGrath M, Nakayama M, Shimizu T, Boenisch O, Magee CN, Abdoli R, Akiba H, Ueno T, Turka L, and Najafian N. Interruption of dendritic cell-mediated TIM-4 signaling induces regulatory T cells and promotes skin allograft survival. J. Immunol. 191, 4447-4455, 2013（査読有）

(7) Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. NK cell-fratricide: dynamic crosstalk between NK cells and tumor cells. Oncoimmunology. e26529, 2013（査読有）

(8) Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, and Ogasawara K. Inhibitory receptor PIR-B is exploited by ***Staphylococcus aureus*** for virulence. J. Immunol. 189, 5903-5911, 2012（査読有）
This article was selected by the Faculty of 1000 as an article of special significance in Immunology.

〔学会発表〕（計４件）
(1) Nakayama M, Underhill DM, Nakamura K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Aderem A, and Ogasawara K. Inhibitory receptor PIR-B is exploited by Staphylococcus aureus for virulence. 第42回日本免疫学会総会　2013年12月11日～13日　幕張

(2) Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, and Ogasawara K. Natural killer cell death by NKG2D-trogocytosis. 55th Annual Meeting-American Society of Hematology 2013年12月7日～10日　New Orleans, LA, USA

(3) Nakayama M, Takeda K, Nakamura K, and Ogasawara K. Trogocytosis-mediated generation of regulatory MHCII-dressed NK cells. 第41回日本免疫学会総会　2012年12月5日～7日　神戸

(4) Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, and Ogasawara K. Effect of particle size of silica on macrophage inflammatory responses. 第41回日本免疫学会総会　2012年12月5日～7日　神戸

〔図書〕（計１件）
中山勝文、小笠原康悦　細菌感染におけるペア型受容体の役割 Surgery Frontier, 21, 41-45, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)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・准教授

研究者番号：20453582

(2)研究分担者
小笠原　康悦（OGASAWARA KOUETSU）
東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号： 30323603

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：