

# 【世界初】カーボンナノチューブを認識する免疫受容体の発見 ～カーボンナノチューブが炎症を引き起こす機構を解明～

立命館大学大学院薬学研究科の山口慎一郎さん(博士課程後期)、同大学大学院生命科学研究科の謝祺琳さん(2022年度博士課程前期修了)、同大学生命科学部の笠原浩太助教(現 JT 医薬総合研究所研究員)、同大学薬学部の中山勝文教授、名古屋大学大学院医学系研究科の豊國伸哉教授らの研究チームは、カーボンナノチューブ(CNT)を認識するヒト免疫受容体を発見しました。本研究成果は、2023年4月7日0時(日本時間)に、イギリスの科学雑誌「Nature Nanotechnology」に掲載されました。なお本研究は、JST 戦略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST)の研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」および JST 戦略的創造研究推進事業個人型研究(さきがけ)の研究領域「生体における微粒子の機能と制御」の支援を受けて、東北大学大学院情報科学研究科の木下賢吾教授らとの共同研究により行ったものです。

## 本件のポイント

- CNT は次世代ナノ材料<sup>\*1</sup>として大きく期待されているものの、一部の CNT はアスベスト様の毒性が懸念されており、その毒性発現分子機構は不明であった。
- 独自のインシリコ探索<sup>\*2</sup>により、世界で初めて CNT を認識するヒト免疫受容体を発見した。
- マクロファージ<sup>\*3</sup>がその免疫受容体を用いて CNT を貪食<sup>\*4</sup>して炎症を引き起こすことを明らかにした。
- 本研究で見いだした免疫受容体および炎症シグナルを標的とした健康被害の予防・治療法の開発が期待される。

## <研究成果の概要>

CNT は多岐にわたる分野での利用が大きく期待されている日本発の次世代ナノ材料ですが、一部の多層 CNT(Multi-Walled CNT: MWCNT)はアスベストに似た炎症毒性を示すことが動物実験で報告されています。しかし MWCNT がどのように生体内で認識されて炎症を誘導するのか、またヒトにおいても同様の炎症毒性が認められるのかについては判っていませんでした。

本研究グループは、免疫細胞の一つであるマクロファージが細胞表面の Siglec-14 というヒト免疫受容体を介して MWCNT を貪食し、炎症を引き起こすことを明らかにしました。また新たに作成した抗 Siglec-14 阻害モノクローナル抗体や Siglec-14 の炎症シグナル阻害薬を用いることによって、MWCNT の炎症毒性を軽減できることが判りました。今後の CNT の実用化に向けて、ヒトでの安全性の担保は重要課題であり、本研究はその一助になることが期待されます。

## <研究の背景>

CNT は 1991 年に飯島澄男先生(現名城大学終身教授・名古屋大学特別招へい教授)の電子顕微鏡解析によって発見され、その高導電性、軽量性、強度などの非常に優れた物性から日本発の次世代

ナノ材料として半導体、電池、医療など多岐にわたる分野での用途が期待されています。しかしながら、2008年以降の動物実験において、一部のCNTにアスベストと同じような毒性が相次いで観察され、2019年に国際化学物質事務局はCNTを有害な物質と判断しました。そのため今後のCNTの研究開発の継続については国際的に大きな議論となっています。

CNTやアスベストは生体内に入ると免疫細胞のマクロファージによく貪食されます。本来マクロファージは体内に侵入した微生物などを貪食するなどして生体防御に重要な役割を担っていますが、アスベストや一部のMWCNTを貪食した場合は、ストレスを強く感じ、そのストレス応答(NLRP3インフラマソーム<sup>※5</sup>活性化を介したIL-1 $\cdot$ などの炎症性サイトカイン<sup>※6</sup>の分泌など)により、慢性炎症を引き起こすことが判ってきました。しかしながら、なぜマクロファージがCNTをよく取り込むのかは依然として不明でした。

### <研究の内容>

本研究グループは最近、世界で初めてMWCNTを認識する受容体としてTim4を発見し、マウス実験においてMWCNTによる炎症にTim4が関与していることを明らかにしました(2021年2月10日立命館大学-JST-東北大学共同プレスリリース<sup>※7</sup>)。しかしその後、ヒト細胞を用いた実験から、Tim4が発現していないマクロファージでもMWCNTを認識することが判り、ヒトではTim4以外の何らかの受容体がMWCNTの炎症に関わっている可能性が出てきました。

Tim4のCNT認識様式は非常に特徴的なものであり、それは通常はタンパク質の表面に出にくい芳香族アミノ酸クラスターがTim4の構造表面には出ており、そのクラスターがCNT認識に必須だというものでした。そのため本研究では、Tim4以外のCNT認識受容体を見つけるために、独自のインシリコ探索を行いました。つまり、すでに結晶構造解析されている約150,000種のタンパク質三次元構造の中から芳香族アミノ酸クラスターを持つヒト受容体を探索し、Siglec-14を見つけ出すことに成功しました。分子動力学シミュレーション<sup>※8</sup>により、Siglec-14とCNTが安定して結合する様子を観察し、その結合モデルに一致してSiglec-14はTim4と同じように芳香族アミノ酸クラスターを介してMWCNTを認識することを実証しました。

興味深いことに、Siglec-14受容体はヒトマクロファージ細胞表面でDAP12というアダプタータンパク質と会合して、spleen tyrosine kinase (Syk)というリン酸化酵素の活性化を經由して炎症シグナルを伝達します。本研究グループは、ヒトマクロファージにおいてSiglec-14がMWCNTを認識するとSykの活性化を介してNF- $\kappa$ Bという転写因子が活性化され、IL-8などの炎症性サイトカインが分泌されること、またMWCNTの貪食作用を誘導することを見いだしました。実際に図1に示すようにヒトマクロファージ系のTHP-1細胞にSiglec-14を発現させるとMWCNTを顕著に細胞内に取り込むようになることが顕微鏡で観察されました。この貪食作用によって取り込まれたMWCNTは食胞を損傷させ、その結果、細胞死とNLRP3インフラマソーム活性化が起きて炎症を引き起こされることが判ってきました(図2)。ヒト末梢血単核球にMWCNTを添加すると炎症性サイトカインが分泌されますが、それは本研究で作成した抗Siglec-14阻害モノクローナル抗体で抑制されることが明らかとなりました。

マウスには Siglec-14 がいないため人為的にマウス肺胞マクロファージに Siglec-14 を導入して MWCNT を投与すると、Siglec-14 を導入していないマウスに比べて肺炎が増悪しました。また、このモデルマウスにおいてホスタマチニブという Syk 阻害薬を経口投与すると、肺炎が軽減することが明らかになりました。これらの結果は、ヒトマクロファージ上の Siglec-14 が MWCNT を貪食して、そのストレス応答により炎症を引き起こすことを示唆します。

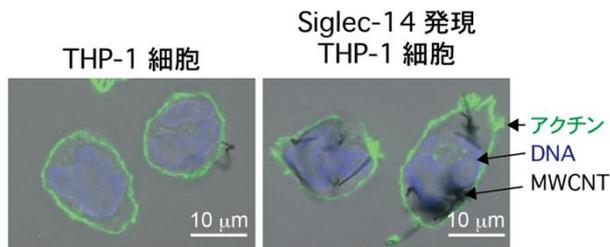
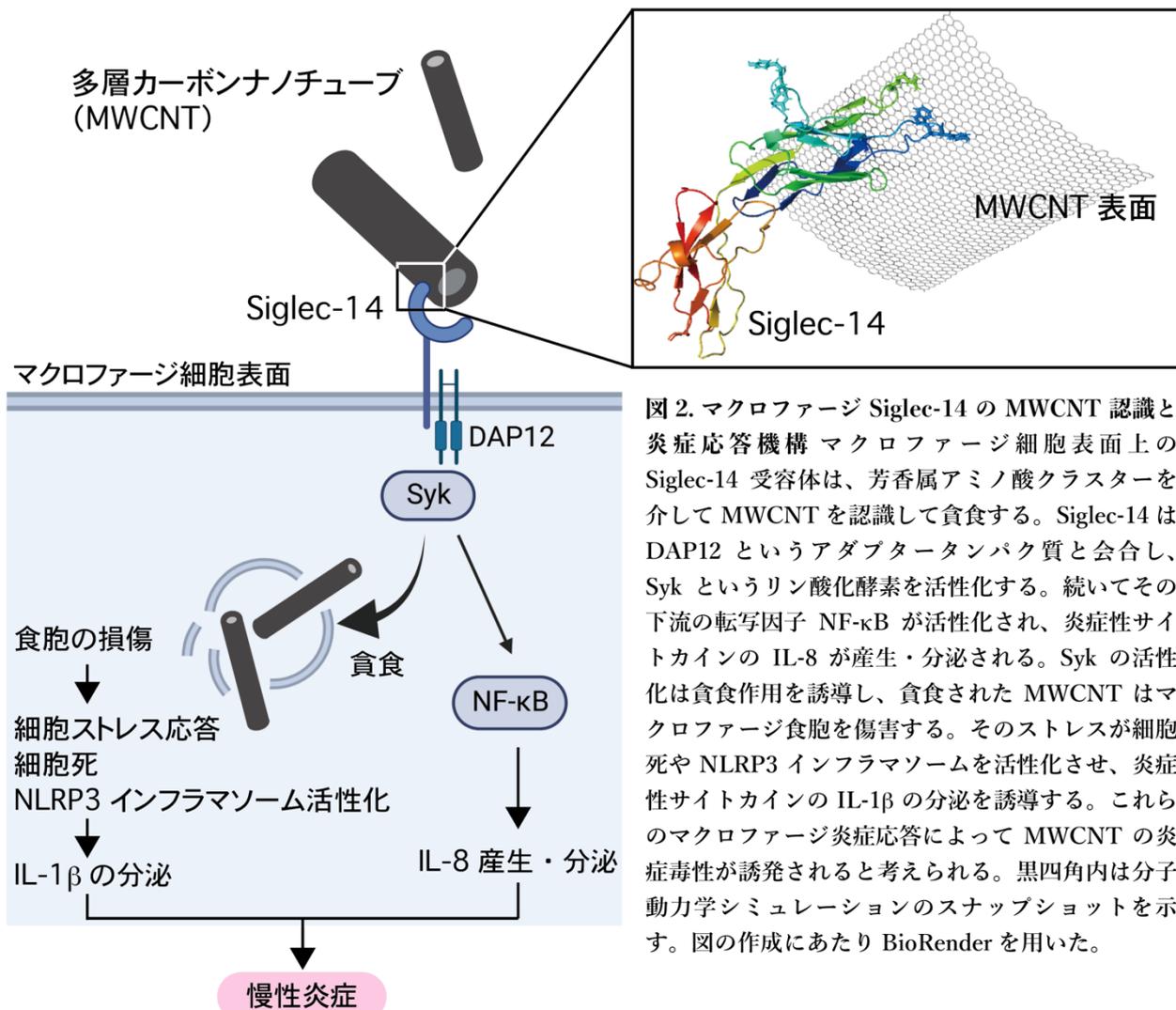


図 1. Siglec-14 を介するマクロファージの MWCNT 貪食 ヒトマクロファージ系 THP-1 細胞、および Siglec-14 を導入した THP-1 細胞それぞれに MWCNT を加えて顕微鏡観察した。Siglec-14 発現 THP-1 細胞は、顕著に MWCNT を細胞内に取り込んでいる（貪食している）様子が判る (Yamaguchi et al., Nat. Nanotechnol., 2023 より転載)。



## <社会的な意義>

本研究成果は、ヒトが実験動物と同じように CNT に曝露された場合の炎症毒性発現メカニズムを明らかにしたものであり、またその場合の治療・予防効果の開発に繋がるものです。現実に CNT がヒトに対して毒性を示すか否かについては今のところはまだ判っていません。化学物質の毒性発現は曝露量にも大きく依存するため、CNT を扱う労働環境などでの曝露量を正確に予測し、そのリスクを慎重に判断していく必要があります。今後、CNT の実用化に向けて、ヒトでの安全性の担保は大きな課題の一つであり、本研究成果はその一助になることが期待されます。

## <論文情報>

論文名：Carbon nanotube recognition by human Siglec-14 provokes inflammation

(Siglec-14 はカーボンナノチューブを認識して炎症を引き起こす)

著者名および所属：Shin-Ichiro Yamaguchi<sup>1,2,12</sup>, Qilin Xie<sup>2,3,12</sup>, Fumiya Ito<sup>2,4</sup>, Kazuki Terao<sup>1</sup>, Yoshinobu Kato<sup>1</sup>, Miki Kuroiwa<sup>1</sup>, Satoshi Omori<sup>5</sup>, Hideo Taniura<sup>6</sup>, Kengo Kinoshita<sup>5,7,8,9</sup>, Takuya Takahashi<sup>3</sup>, Shinya Toyokuni<sup>2,4,10</sup>, Kota Kasahara<sup>2,3,11,\*</sup>, and Masafumi Nakayama<sup>1,2,\*</sup>

(山口慎一郎, 謝祺琳, 伊藤文哉, 寺尾和希, 加藤 慶宜, 黒岩美希, 大森聡, 谷浦秀夫, 木下賢吾, 高橋卓也, 豊國伸哉, 笠原浩太, 中山勝文)

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Microbiology, College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan

<sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Japan

<sup>3</sup>Computational Structural Biology Laboratory, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan

<sup>4</sup>Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

<sup>5</sup>Graduate School of Information Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan

<sup>6</sup>Laboratory of Neurochemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan

<sup>7</sup>Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University, Sendai, Japan

<sup>8</sup>Advanced Research Center for Innovations in Next-Generation Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan

<sup>9</sup>Department of In Silico Analyses, Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan

<sup>10</sup>Center for Low Temperature Plasma Science, Nagoya University, Nagoya, Japan

<sup>11</sup>Current address: Central Pharmaceutical Research Institute, Japan Tobacco Inc., Takatsuki, Japan

<sup>12</sup>Contributed equally

\*Corresponding author

発表雑誌:Nature Nanotechnology

掲載日:2023年4月7日0時(日本時間)

DOI: 10.1038/s41565-023-01363-w

URL: <https://www.nature.com/articles/s41565-023-01363-w>

### <用語説明>

#### ※1 ナノ材料

粒径がおよそ 100 nm 以下の材料を示し、次世代の産業技術基盤として、多岐にわたる分野での利用が期待されている。

#### ※2 インシリコ探索

コンピューター上で仮想実験に基づいて、候補物質を探索する手法を意味する。本研究では、この手法により約 150,000 種のタンパク質三次元構造の中から芳香族アミノ酸クラスターを持つ受容体を探索した。

#### ※3 マクロファージ

免疫細胞の一つで、体内に侵入した病原性微生物などを貪食するなどして生体防御の砦として重要な役割を担う。その一方で過剰な炎症を引き起こして病気を誘発することもある。

#### ※4 貪食

マクロファージなどが異物を細胞内に取り込み、消化し、分解する作用を示す。

#### ※5 NLRP3 インフラマソーム

さまざまな細胞内ストレスによって形成される炎症誘導性タンパク質の複合体であり、この形成によって炎症性サイトカインの IL-1 $\cdot$ が分泌される。

#### ※6 炎症性サイトカイン

免疫細胞から産生・分泌される液性因子であり、炎症を誘発する作用を持つ。

#### ※7 立命館大学-JST-東北大学共同プレスリリース 2021年2月10日

[https://www.ritsumei.ac.jp/profile/pressrelease\\_detail/?id=421](https://www.ritsumei.ac.jp/profile/pressrelease_detail/?id=421)

※8 分子動力学シミュレーション

タンパク質などの分子およびその集合体を構成する原子の動きをニュートンの運動方程式に基づいてコンピューターの中で再現する手法を意味する。