

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和5年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージ細胞株を用いた微粒子応答の解析

研究分担者 黒田悦史

兵庫医科大学 医学部 免疫学講座 主任教授

研究要旨

本研究では吸入性微粒子のヒトにおける有害性評価の指標として肺胞マクロファージの役割に注目し、ヒトの肺胞マクロファージの細胞株を用いた炎症性微粒子の *in vitro* 評価法を立ち上げることを目的とする。初代ヒト肺胞マクロファージを株化するために、SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを作製した。これらをヒト肺胞マクロファージに感染されることで肺胞マクロファージの増殖因子である GM-CSF を産生する細胞株の作製を試みた。

A. 研究目的

吸入曝露された微粒子は主に肺胞マクロファージにより貪食されると考えられている。そのため微粒子に対する肺胞マクロファージの応答を解析することは微粒子による肺の炎症を予測する上で重要であると考えられる。一般に、化学物質の *in vitro* 評価法では RAW 細胞(マウス)や THP-1 細胞 (ヒト) などのマクロファージ細胞株が用いられる。しかしながら最近の研究より肺胞マクロファージは分化や性質が他の組織マクロファージとは大きく異なることが明らかにされている。そのため、微粒子による肺の炎症を評価するためには肺胞マクロファージを用いた評価法が重要であると考えられる。研究分担者の黒田はマウスの肺胞マクロファージを株化することに成功した。この細胞株は肺胞マクロファージの性質を維持しており、この細胞を用いて *in vitro* における微粒子の有害性評価を進めている。本研究ではさらにヒトの肺胞マクロファージを株化するこ

とでヒトへの外挿性が高い微粒子の *in vitro* 評価法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

マウス肺胞マクロファージ細胞株作製時には SV40 large T 抗原とマウス GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを用いた。そこでヒトにおいても同様に、SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを作製した。またヒトの細胞はマウスよりも株化しにくい可能性があるため、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の発現ベクターおよび TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターも作製した(連携研究者: 産業医科大、和泉弘人博士)。ヒト肺胞マクロファージは EPITHELIX 社より購入した (Batch Number : MΦ0895, MΦ0889FAC)。凍結保存された肺胞マクロファージを起こし、専用培地にて 2 日間培養した。その後細胞を回収し、FACS Aria にて CD45⁺CD11b⁺

細胞をソーティングした。得られた細胞をさらに専用培地にて2日間培養したのちに、SV40 large T 抗原およびヒト GM-CSF 発現ベクターを感染させ、細胞の株化を誘導した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については「カルタヘナ法」を遵守して研究を進めている。また動物を用いた実験については兵庫医科大学の動物実験規定を遵守し実験を進めている。

C. 研究結果

EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージは線維芽細胞のコンタミが認められた。線維芽細胞は通常の状態でも増殖するため、最初の株化誘導実験では線維芽細胞に埋もれてしまい、マクロファージの株化細胞(線維芽細胞に比べてはるかに増殖が遅い)を得ることはできなかった。そこで、2回目の実験ではFACSにてマクロファージのマーカであるCD45⁺CD11b⁺細胞をソーティングし、得られた細胞に対してSV40 large T 抗原とヒトGM-CSFの遺伝子導入を行った。1月4日時点で、形質転換され増殖した株化した細胞と思われるコロニーを4つほど認めている(下図)。

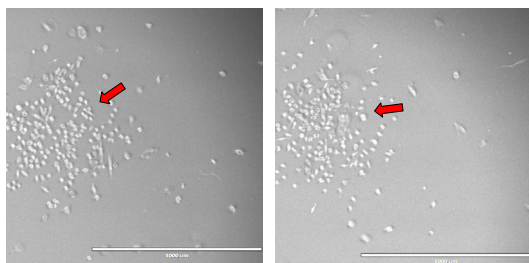


図 遺伝子導入後に認められた細胞のコロニー(矢印)

3月1日時点で上記の細胞については増殖は認められるものの細胞株としては増殖が遅い状態であった。そこで並行して3回目の実験も進めている。3回目の実験は

ソーティング後に細胞の密度を高くし、遺伝子導入効率をより高くした条件で行なった。こちらも4月1日時点で経過を観察している。

D. 考察

種々の化学物質の *in vitro* 試験においては、データの試験間変動や施設内外再現性の問題から細胞株が用いられることが多い。例えばマクロファージを用いた試験法ではマウスでは RAW264 や J774、ヒトでは THP-1 や U937 などが頻繁に使用されている。一方でマクロファージは常在する組織ごとに異なる機能を有していることが報告されており、特に肺胞マクロファージについては分化や機能について他の組織マクロファージとは大きく異なると言われている。しかしながら肺胞マクロファージの細胞株は未だ作製されておらず(マウスの MH-S 細胞は肺胞マクロファージの細胞株とされているが、肺胞マクロファージの性質は失っている。)、より正確性が高い試験法の開発のためには肺胞マクロファージの細胞株を使用することが望ましいと考える。このような背景から、研究分担者の黒田はマウスの肺胞マクロファージの細胞株を樹立し、その細胞株を用いた微粒子の *in vitro* 試験法の開発を進めている

一方、ヒトへの外挿性を考えた場合はヒトの肺胞マクロファージの細胞株が求められる。そこで本研究ではヒトの肺胞マクロファージ細胞株を樹立し、ヒト細胞株を用いた微粒子の *in vitro* 試験法の開発を目指すことを目的としている。現在はヒト肺胞マクロファージに不死化遺伝子を導入し、増殖した株化細胞と思われるコロニーを複数個ほど認めている。また並行して、新たな肺胞マクロファージを準備し、株化を進めている。細胞の増殖を待ち、良好に

増殖する細胞が得られれば、表面抗原の発現を中心に細胞のキャラクタリゼーションを行う予定としている。

3. その他

E. 結論

ヒト肺胞マクロファージに対して不死化および増殖に関与する遺伝子を導入することで形質転換を行なった。これらの細胞が十分な増殖を示せば、細胞のキャラクタリゼーションに進みたいと考えている。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

1. Inoue H, Adachi T, Izumi H, Kuroda

E : Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), JSICR/MMCB 2023 (2023.5.25, Wakayama)

2. Adachi T, Inoue H, Izumi H, Kuroda

E : Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), 第30回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 神奈川)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録