

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6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

吸入性微粒子に応答する肺胞マクロファージに注目し、微粒子応答のメカニズム解析とヒトの肺胞マクロファージ細胞株作製を試みた。細胞株作製についてはヒト肺胞マクロファージへの不死化遺伝子の導入により不死化には成功したが良好な増殖スピードを有した細胞株は得られなかった。また微粒子に応答する肺胞マクロファージの解析により、微粒子に応答し炎症性サイトカインである IL-1 α を放出する細胞は全体のごく一部であることが明らかとなり、このような肺胞マクロファージサブセットの性質を詳細に解析することが、微粒子による炎症反応の理解につながると考えられた。

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おり、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。前回までの研究において、研究分担者の黒田らはマウスの肺胞マクロファージの株化細胞を樹立し、細胞株を用いた微粒子応答の評価を行った。さらに同様の手法を用いて、ヒトの肺胞マクロファージの株化を試みた。

また、マウス肺胞マクロファージを用いた微粒子の評価では、微粒子を貪食した肺胞マクロファージの細胞死と、それに伴い放出される IL-1 α が指標になることを認めている。この現象は肺胞マクロファージに特有な現象であり、炎症を引き起こさない微粒子では細胞死も IL-1 α の放出も認められない。そのため微粒子による細胞死と IL-1 α 放出のメカニズムを明らかにすることは炎症を引き起こす微粒子の性質を理解

する上で重要であると考えられる。

そこで本研究では微粒子による肺胞マクロファージの細胞死と IL-1 α を放出のメカニズム解析を進めるとともに、ヒトの肺胞マクロファージを株化する。これにより、微粒子による炎症誘導機構を明らかにするとともに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

<ヒト肺胞マクロファージの株化>

ヒト肺胞マクロファージは EPITHELIX 社より購入した (Batch Number: M Φ 0889FAC)。株化のためのベクターとして、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。さらに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。また変異型 RAS の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を専

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。得られた細胞にSV40 large T抗原、ヒトGM-CSF発現ベクター、TERT発現ベクターおよびTP53とRB1に対するsiRNAベクターを感染させ、細胞の株化を試みた。

<細胞死とIL-1 α 放出のメカニズム解析>

細胞内に蓄積されたIL-1 α の産生を可視化するためにIL-1 α のプロモーター下に蛍光物質であるmCherryを挿入したIL-1 α リポーターマウスを作製した。野生型マウスあるいはリポーターマウス由来の肺胞マクロファージを用いて、IL-1 α 産生のライブイメージング、細胞内IL-1 α 染色の蛍光観察を行い、肺胞マクロファージの細胞内IL-1 α の蓄積と放出のメカニズムの解析を行った。

(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

<ヒト肺胞マクロファージの株化>

昨年度に引き続き、遺伝子導入を行なったが細胞は不死化しているものの、十分な増殖スピードは得られなかった。そこで不死化したマウスに変異型RASの遺伝子を導

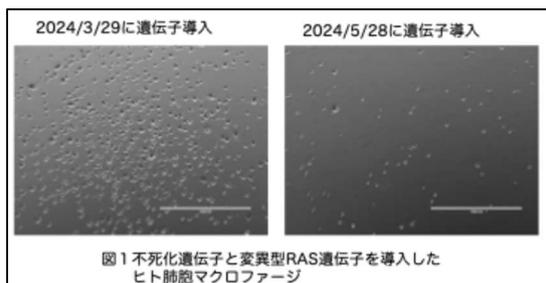
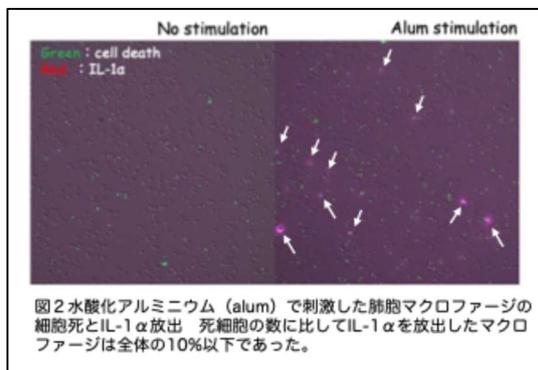


図1 不死化遺伝子と変異型RAS遺伝子を導入したヒト肺胞マクロファージ

入したが、増殖スピードの改善は認められなかった(図1)。以上の結果より、マウスの細胞と比較してヒト由来の細胞では細胞株化は困難であると考えられた。

<細胞死とIL-1 α 放出のメカニズム解析>

マウス肺胞マクロファージをin vitroにてアルミニウム塩(水酸化アルミニウム)の微粒子で刺激し、細胞死とIL-1 α 放出をライブセルイメージングにより解析したところ、細胞死に伴ってIL-1 α を放出する細胞は全体の10%以下であった(図2)。



そこで、肺胞マクロファージ内に蓄積されたIL-1 α を可視化する目的でIL-1 α のプロモーター下に蛍光物質であるmCherryを挿入したIL-1 α リポーターマウスを作製した。このマウスから肺胞マクロファージを回収し、mCherryの蛍光を観察したところ、IL-1 α の放出と同様に約10%のマクロファージがmCherryを強く発現していた。これらの細胞が微粒子に反応し、IL-1 α を放出する肺胞マクロファージサブセットであると考え、現在このmCherry陽性細胞の解析を進めている。

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。さらにヒトへの外挿性を考えた場合、

ヒトの細胞株を樹立することが重要であると考え、ヒト肺胞マクロファージの細胞株の作製を試みた。種々の遺伝子導入を行った結果、不死化までは可能であったが、十分な増殖スピードを持った細胞株を得ることができなかった。今後は、iPS細胞からヒト肺胞マクロファージを誘導するプロジェクトの方に引き継ぐことになった。

細胞株のプロジェクトと並行して、微粒子による炎症誘導のメカニズムの解析を進めている。これまでの研究成果から、炎症を引き起こす微粒子を貪食した肺胞マクロファージは細胞死を引き起こすとともに、細胞内に蓄積した IL-1 α を放出し、炎症を誘導することを見出してきた。しかしながらライブイメージングを用いた解析により、細胞死によって IL-1 α を放出する肺胞マクロファージの割合は 10%以下であり、ほとんどの細胞が IL-1 α を放出しない細胞死であった。これらの結果は、微粒子によって肺の炎症を引き起こしている肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、それらの細胞を用いた微粒子の安全性の評価が必要であると考えられる。

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が、十分な増殖スピードを有する細胞は得られなかった。

また、微粒子に応答し肺の炎症を引き起こす IL-1 α を放出する肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、このような細胞集団を用いた微粒子の安全性評価の開発が重要であると考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

F.2. 学会発表

1. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 32 回日本臨床環境医学会学術集会 (2024.6.9)
2. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
3. 黒田悦史: 肺胞マクロファージ細胞株を用いた炎症性微粒子評価法の開発および微粒子の化学的特性の解析. 2024 年度日化協 LRI 研究報告会 (2024.8.23)
4. Hinata Inoue, Takumi Adachi, Etsushi Kuroda: The novel evaluation approach for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし