

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7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 教授

研究要旨

本年度は、ヒト肺胞マクロファージを用いた評価において重要な、細胞の不均一性を理解するために、siRNA シーケンスを用いて検討したところ、肺胞マクロファージのシグネチャー遺伝子である ITGAM(CD11b)、ITGAX(CD11c)、PPARG(PPAR γ) の発現が高いクラスターと発現が低いクラスターの存在が認められ、不均一な細胞集団であることが明らかとなった。またマウスを用いた微粒子応答の解析を行い、肺胞マクロファージの微粒子応答に重要と思われる候補遺伝子を同定した。

A. 研究目的

化学物質の免疫系への影響評価として *in vitro* ではマクロファージを用いた評価が行われる。現在、本研究課題においては、様々なヒト方法マクロファージ様細胞を用いた評価法の研究が進められている。しかしながらヒトの肺胞マクロファージにどの程度の不均一性が存在するのか、またそれがどのような遺伝子発現に違いとして分布しているのかについては、いまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では EPITHELIX 社より購入した2種のヒト肺胞マクロファージを用いてシングルRNA シーケンス解析を行うことで、その疑問の解決を試みた。

また、マウスを用いた微粒子応答の研究を進め、微粒子応答に重要と考えられる遺伝子 X および遺伝子 Y を同定し、これらの遺伝子の微粒子応答における重要性を検討した。

B. 研究方法

B.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発（足利、善本、黒田）

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。本年度は、微粒子感作に関与する遺伝子の探索とその欠損マウスを用い、微粒子によるアレルギー性炎症のメカニズム解析を進めた。またヒト肺胞マクロファージのシングルセル RNA シーケンス解析を行い、ヒト肺胞マクロファージに発現するシグネチャー遺伝子についての検討を行った。

EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージ（Batch Number：MΦ0889 および 0940）を *in vitro* にて2日間培養した。その後細胞を回収し、大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室にシングルセル RNA シーケンス解析を依頼した。得られた解析データは Python を用い、Scanpy パッケージにて解析した。検出遺伝子数や転写産物の数などの指標を元に低品質の細胞を除外し、遺

伝子発現の正規化と対数変換を行うことで、細胞間の発現比較が可能となるデータを作成した。遺伝子発現データの特徴については主成分分析(PCA)による次元削減を行ない、その情報をもとに遺伝子発現パターンの類似性に基づいて細胞集団を分類した。クラスタリングは t-SNE により可視化した。本研究ではさらにヒト肺胞マクロファージに発現するシグネチャー遺伝子について、dot plot を用いて各クラスターにおける発現量および発現細胞割合を比較解析し、クラスター間の特徴の違いを評価した。

マウス肺胞マクロファージの微粒子応答については、研究分担者らが見出した微粒子応答に関連する遺伝子 X および遺伝子 Y の遺伝子欠損マウスを作製した。それらのマウスの気道に抗原（卵白アルブミン：OVA、10 ug/マウス）とアルミニウム塩（アラム、50 ug/マウス）を投与し、さらに2週間後に OVA を3回暴露することで誘導される OVA 特異的 IgE 量を測定した。誘導された IgE 量から微粒子のアレルギー性炎症感作性における両遺伝子の関与について評価した。また、マウスの肺胞マクロファージから樹立した細胞株 ALV3.7 を用いて、遺伝子 X および遺伝子 Y の活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入し、細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現するシステムの構築を試みた。

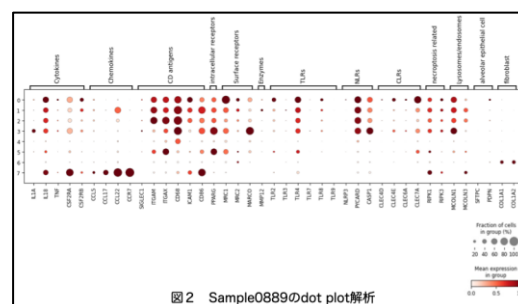
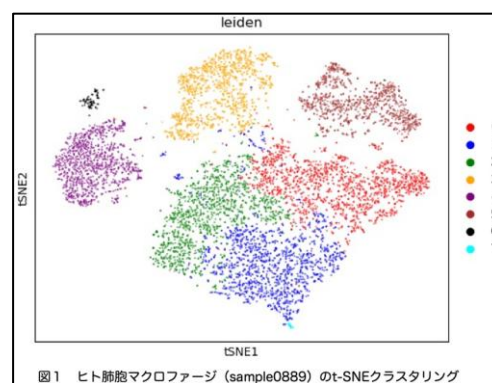
（倫理面への配慮）

兵庫医科大学においては兵庫医科大学動物実験規程、兵庫医科大学研究倫理規程に従い、動物実験計画書を作成し、動物実験委員会の承認を受けて、研究を行っている。承認番号 25-020AG 「微粒子アジュバント投与による肺の炎症モデルマウスの作製とその免疫学的解析」

C. 研究結果

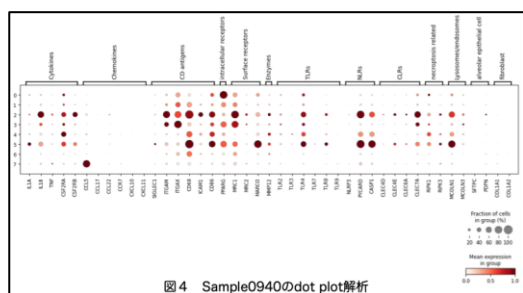
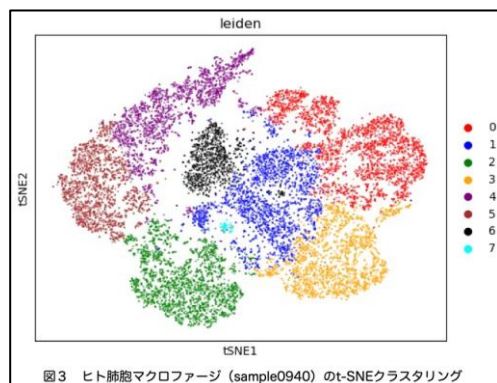
C.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発（足利、善本、黒田）

シングルセル RNA シーケンス解析についてはドナーが異なる 2 種の細胞について解析した。Sample 0889 のクラスタリングの結果を図 1 に、各クラスターの遺伝子発現の dot plot 解析を図 2 に示す。



クラスター 0、1、2 は大きなクラスターを形成しており、Dot plot の解析から、肺胞マクロファージのシグネチャー遺伝子である ITGAM (CD11b)、ITGAX (CD11c)、PPARG (PPAR γ) の強い発現が認められた。このクラスターの細胞では、本研究で注目している ICAM1 (ICAM-1) の強い発現も認められた。クラスター 6 は I 型コラーゲン分子である COL1A1 (collagen type I $\alpha 1$ 鎖) および COL1A2 (collagen type I $\alpha 2$ 鎖) を発現していることから線維芽細胞と考えられた。クラスター 3 ~ 5、7 についてはを進めている。

次に Sample 0940 のクラスタリングの結果を図3に、各クラスターの遺伝子発現のdot plot解析を図4に示す。



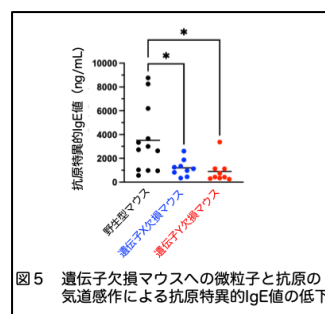
Sample 0889 とは大きく異なり、クラスター0、1、2、3、7で大きなクラスターを形成していた。Dot plot の解析から、クラスター1、2、3において、ITGAM (CD11b)、ITGAX (CD11c)、PPARG (PPAR γ) の発現が認められたが、発現分布のバラツキが大きかった。また、クラスター2において、ICAM1 (ICAM-1)の発現が認められた。

本研究ではマウス肺胞マクロファージの微粒子応答の検討も進めている。最近、微粒子応答に関連する遺伝子Xおよび遺伝子Yを見出し、その遺伝子欠損マウスを作製した。そこでこれらのマウスを用いて微粒子の気道感作によるアレルギー性炎症誘導について検討した。抗原とアルミニウム塩を気道に投与した後に抗原を曝露することでアレルギー状態を誘導した。

血清中の抗原特異的IgEを測定したところ、遺伝子Xおよび遺伝子Yの欠損マウスでIgE値の低下が認められた(図5)。

これらの遺伝子群を用いた微粒子の感作性試験への応用として、我々が樹立した

肺胞マクロファージ細胞株ALV3.7に、遺伝子Xおよび遺伝子Yの活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入し、細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現する細胞を作製した。このリポーター細胞の評価法における有用性について検討を行っている。



D. 考察

D.1. 化学物質のin vitro呼吸器感作性試験法の開発(足利、善本、黒田)

化学物質の免疫系への影響評価としてin vitroではマクロファージを用いた評価が行われる。現在、本研究課題においては、様々なヒト方法マクロファージ様細胞を用いた評価法の研究が進められている。しかしながらヒトの肺胞マクロファージにどの程度の不均一性が存在するのか、またそれがどのような遺伝子発現に違いとして分布しているのかについては、いまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究ではEPITHELIX社より購入した2種のヒト肺胞マクロファージを用いてシングルRNAシーケンス解析を行うことで、その疑問の解決を試みた。

実験結果としてsample0889の解析結果は非常に安定しており、t-SNEプロットにより不均一性ははっきりと示された。また既知の肺胞マクロファージのシグネチャー遺伝

子の分布も特定クラスターに集中していた。いくつかのクラスターは分化途中のマクロファージであると考えており、現在 RNA velocity 解析により分化の方向性の解析を試みている。一方で、sample0940 では t-SNE プロットにおいて一つのクラスター用の構造を示したが、シグネチャー遺伝子の発現分布にバラツキが認められた。この要因は sample0889 と sample0940 のサンプルの違いに起因していると考えられ、データシートの情報から sample0889 は 20 代、sample0940 は 60 代のサンプルであった。一般に肺胞マクロファージは加齢に伴って本来の肺胞マクロファージの性質とは異なるマクロファージが増えてくると考えられていることから、若いサンプルである sample0889 の方が安定したクラスターを形成しているのではないかと考えられた。

また、マウスを使用した実験においては、最近研究分担者らが見出した微粒子応答に関連する遺伝子 X および遺伝子 Y について、それらの遺伝子欠損マウスを作製した。実際に微粒子と抗原の気道感作により誘導される抗原特異的 IgE 値を評価したところ、どちらの遺伝子欠損マウスにおいても IgE 値の低下が認められた。これらの遺伝子群を用いた微粒子の感作性試験への応用として、遺伝子 X および遺伝子 Y の活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入した肺胞マクロファージ細胞株を作製した。理論的には細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現すると考えられ、現在、検討を行っている。

E. 結論

E.1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発（足利、善本、黒田）

ヒト肺胞マクロファージのシングルセル

RNA シーケンス解析を行い、ヒト肺胞マクロファージの不均一性とそれを定義づける種々の遺伝子群を明らかにすることができた。また本研究において評価法として注目している遺伝子が発現していることも確認した。

またマウスを用いた実験において、微粒子の気道感作性に関与する遺伝子を見出し、その欠損マウスでは微粒子の気道感作によって誘導される IgE 産生の低下が認められた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

F.2. 学会発表

1. Kuroda E. Molecular mechanisms of particulate-induced inflammation and allergy in lung immunity. IUTOX 17th International Congress of Toxicology (2025.10.17), Symposium, Beijing, China.

G. 知的所有権の取得状況

（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし