

研究課題名：石綿関連疾患の治療法開発に貢献する新規疾患モデル開発についての研究

研究代表者：山野荘太郎

研究年度：令和 6 年度

研究目的

石綿関連疾患（肺がん、中皮腫、びまん性胸膜肥厚、良性石綿胸水、石綿肺）の労災認定状況として1990年代から増加し、近年では年間1000件を超えて高止まりしている。中皮腫のみならず、石綿肺やびまん性胸膜肥厚など、石綿関連疾患の多くは、現在においてなお、効果的な治療法が開発されていない、または治療法が存在しない事が問題となっている。今後の解体工事の増加に伴う石綿関連疾患罹患者の更なる増加リスクを鑑みると、石綿関連疾患の予防や治療法開発に向けた非臨床的手法を用いた知見を集積することは我が国の労災疾病/労働衛生問題として喫緊の課題である

近年我々の研究チームは、種々の実験動物を比較し、ヒトの肺と臓器-細胞レベルで極めて類似した肺を有する実験動物としてブタを見出すと共に、さまざまな職業性肺疾患の原因となる化学物質（アクリル酸系ポリマー、結晶質シリカ、ナノマテリアル等）をブタの肺に直接投与する手法を開発し、職業性肺疾患を誘発すると共にその分子機序について1細胞解像度で解析するプロジェクトを世界に先駆けて着手している。本研究の目的は、3年間の研究期間内において、ブタを用いて石綿関連疾患の疾患モデルを開発する事である。

研究方法

課題 1. マイクロミニブタを用いた動物実験（3 ヶ月）

体重 10 kg未満のマイクロミニピッグ 4 頭を富士マイクラ株式会社（静岡）より導入した。馴致期間を経てのち、実験を実施した。4 頭のマイクロミニピッグの気管支内もしくは胸腔内へ 20 mg/kg BW のクロシドライトを PBS に懸濁させ 10ml を動物の右肺もしくは右胸腔内へ投与した。被験物質投与前、投与後 3 日、1 か月、3 か月（解剖前）に胸部 CT イメージを取得した。3 か月の観察の後、全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、肺を摘出し各種解析に供じた。

課題 2. 先進医学解析技術を用いた肺及び胸膜細胞における解析

中皮細胞は病理学的には胸膜組織近辺に濃縮されていることから、まずブタ 1 頭の肺より、(1)外科的に胸膜下組織を切り出した検体、(2)胸膜をカミソリにより物理的に剥ぎ取った検体、の 2 種類の手法で検体を得た。これまでヒトやマウス肺検体で十分な実績のある徐冷凍結保存液(CELLBANKER)で凍結保存し、(1)の検体は複数に分割し、3 種類の異なる徐冷凍結保存液(CELLBANKER1, CELLBANKER2, STEM-CELLBANKER GMP GRADE)で保存した。それぞれの検体を解凍後、ハサミで細かく刻んだあと酵素消化し(RPMI1640,10mM HEPES pH7.4, 10% FBS, 0.25 mg/ml Liberase TM, 4KU DNase I, 200rpm で震盪しながら 37 度 60min 消化。20 分ごとに注射針をもちいて agitation)、Percoll を用いた比重遠心分離により死細胞とデブリを除去した。得られた細胞を TAS-Seq2 法により 1 細胞 RNA-seq 解析を行った。加えて、8 症例のヒト胸膜の 1 細胞 RNA-seq データは、GEO データベースに保管されている GSE243446 (Obacz J et al. Eur Respir J. 2024) を用いた。GEO に保管されている rds フォーマットファイルを用いて、R

言語上で起動する 1 細胞 RNA-seq データ解析プログラム Seurat を用いて解析を行った。マーカー遺伝子の発現パターンより、中皮細胞のクラスターの同定を行った。1 細胞レベルでの遺伝子の発現プロファイルを用いてヒトとブタデータの比較解析を実施した。

結論

課題 1. マイクロミニピッグを用いた動物実験 (3 ヶ月)

マイクロミニピッグの肺 HRCT 画像から、気管支内投与を行なった 2 頭では、投与 3 日後に投与部位特異的に広範なコンソリデーションを認めると共に、時間経過と共にコンソリデーションは軽快する代わりに、網状影が認められた。これらは石綿線維投与による病変が肺胞気腔から広義間質にシフトすることによる変化を示していると考えられた。次に胸腔内投与を行った 2 頭では、投与 3 日後に投与手技に伴う空気が胸腔内で観察される（気胸/縦隔気腫様画像）と共に、胸膜領域にコンソリデーションを認めた。これらの画像所見は、時間経過と共に軽快する事がわかった。病理組織学的解析を実施した結果、肺内に投与した 2 頭では、両動物共に呼吸細気管支から肺胞領域にかけて石綿線維を多数観察すると共に、一部は鉄をまとった石綿小体として認められた。線維の大部分はマクロファージに貪食されており、多核化した貪食マクロファージが散見された。呼吸細気管支壁では貪食マクロファージの集簇及びリンパ球を主体とした炎症と共に、膠原繊維の増生が観察された。胸腔内に投与した動物では、2 頭共に、投与側の右胸腔内で石綿貪食マクロファージを主体とする肉芽腫性胸膜炎を認め、2 頭中 1 頭は、臓側胸膜と壁側胸膜の強度の癒着を認めた。胸膜の病理組織学的解析より、石綿貪食マクロファージが散見され、炎症性肥厚が生じていた。

課題 2. 先進医学解析技術を用いた肺及び胸膜細胞における解析

ブタの胸膜細胞の複数の取得方法を比較検討し、中皮細胞およびその周辺部位を構成する細胞の両者を、十分な解像度で解析可能な系を確立した。石綿関連の疾患を 1 細胞レベルで評価する上での基盤技術が確立された。

さらに、複数の手法でブタの胸膜細胞を収集し、ブタの中皮細胞のデータの取得に成功した。次の段階として、石綿関連の疾患を評価する上での対象となる細胞の特定ができた。さらに、ヒト胸膜由来の中皮細胞とブタ胸膜由来の中皮細胞の比較検討から、ヒトとブタの中皮細胞に共通して発現している遺伝子やブタ特異的に発現している遺伝子が分かった。

今後の展望

令和 6 年には、前例のないブタへの石綿投与実験（パイロット実験）を実施できた。この結果を踏まえて、2024 年 12 月から 2026 年 12 月にかけて、長線維長のクロシドライトで、8 頭のマイクロミニピッグを用いた肺内単回投与後 2 年間観察試験を行い、石綿肺及び合併性の肺がん誘発を目的とした 2 年間の試験を実施中である。本研究の遂行により、これまでの齧歯類と一線を画す大型動物によるモデル開発を行い、発がん性評価までを見

据えたヒト疾患に類似した疾患モデル開発を行い、治療薬開発や石綿関連疾患の診断バイオマーカー開発等に資する研究ツールを創出し、国のがん予防施策や石綿関連疾患の行政政策に貢献し、社会に還元できる研究となることが期待される。