労災疾病臨床研究事業費補助金

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

令和6年度　総括･分担研究報告書

研究代表者　山野　荘太郎

令和７（２０２５）年　３月

目　　次

Ⅰ．総括研究報告
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 -- 1
山野荘太郎

II. 分担研究報告
１．マイクロミニピッグの病理評価 ---------- 11
山野荘太郎

２．マイクロミニピッグを用いた石綿投与実験 ---------- 15
高須正規

３．ブタ肺からの中皮細胞１細胞遺伝子発現解析に関する研究 ------- 19
七野成之

４．ブタとヒトの胸膜細胞における１細胞解析結果比較に関する研究 ----- 22
山本雄介

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 26

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和 6 年度総合研究報告書

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（240202-02）

研究代表者　山野荘太郎　労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員

研究要旨

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、ブタを用いて石綿線維を投与し、石綿関連疾患の疾患モデルを開発する事である。

R6 年度は、2 年間の長期観察に先立ちパイロット試験として実施された、石綿線維を肺内または胸腔内に単回投与したブタの３ヶ月観察後の肺及び胸腔臓器の病理組織学的変化を検討した。加えて、ブタ肺からの中皮細胞 1 細胞遺伝子発現解析及びブタとヒトの胸膜細胞における 1 細胞解析（先進医学解析技術）結果比較に関する研究を実施した。

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、膠原線維の増生が観察された）。胸腔内に投与した 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。ベルリンブルー染色を実施した結果、鉄タンパク質の付着が一部の石綿線維で開始していることが示唆された。ブタ肺からの中皮細胞検出を目的とした 1 細胞遺伝子発現解析では、組織の採取手法及び細胞の保存液について検討した結果、最適な中皮細胞の採取及び保存方法を確立できた。さらにブタとヒトの中皮細胞における 1 細胞解析の結果、ヒト中皮細胞の遺伝子シグネチャーにブタ中皮細胞が類似することが明らかとなった。

以上のことから、本年度、これまで前例のなかった「ミニブタへの石綿投与」が実現し、特に肺内投与による病変分布が実臨床に酷似しており、ブタは労働者に類似する石綿関連疾患、特に石綿肺の発症-進展が評価可能となる事に期待できる知見を得た。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。加えて、ブタ肺組織から中皮細胞を含む構成細胞の 1 細胞解析の研究開発技術の確立ができた。

研究分担者
高須正規　岐阜大学 准教授
七野成之　東京理科大学　講師
山本雄介　国立がん研究センター研究所 独立ユニット長

A．研究目的

我が国における石綿使用建築物の解体棟数は、2030年頃のピークに向けて現在増加している。令和5年4月より5ヵ年計画として開始された第14次労働災害防止計画では、主たる健康障害防止対策として、石綿使用建築物の解体工事において石綿ばく露防止対策の強化を推進することが計画されている。一方で、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。2019年に中皮腫で死亡された患者は1466人を記録し、1995年の500人から約3倍もの増加が見られている。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。自律的に保証制度を活用し労災認定された労働者を氷山の一角と捉えた際に、水面下にはそれを上回る石綿関連疾患の潜在的罹患者が存在する事が想定され、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。齧歯類を用いた研究と比較した結果、職業性肺疾患のための疾患モデル動物として、労働者の臨床病理に対する再現性の観点から【ブタ】の有用性に強く期待できる研究成果を得つつある。 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。
R6年度は、小葉間隔壁ならびに呼吸細気管支を持つブタに石綿を投与しその病態病理を把握すること主目的とし、2年間の動物実験の実施に先立ち、合計4頭のマイクロミニピッグを用いた単回投与３ヶ月観察の動物実験（パイロット試験）を実施した。また、石綿関連疾患の重要な現象の一つに、肺胸膜の中皮細胞の性質変容と悪性中皮腫の発生がある。その分子機序を解明する上で、個々の細胞の性質の違いを網羅的に解析可能な1細胞RNA-seqは効果的なツールであるが、通常の肺検体の取得方法では中皮細胞はごく微量しか含まれず、十分な解析が困難であった。本年度の分担研究では、ブタ肺より中皮細胞を効果的に濃縮して取得し、1細胞RNA-seq解析を行うための実験系の確立を行った。さらに、ヒトとブタの胸膜組織は形態的に類似していると考えられているが、1細胞RNA-seq解析を用いた遺伝子発現レベルでの詳細な解析は行われていない。中皮細胞において石綿関連疾患の評価を行うにあたり、1細胞レベルでのブタ中皮細胞の解析は必須である。本研究では、ヒト胸膜組織データとブタ胸膜組織細胞のデータの比較解析を実施することで、ブタ由来の中皮細胞の特定並びに性状解析を行った。

Ｂ．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）

１．石綿投与 3 か月のモニタリング

１）使用動物と投与物質

体重 6.9 から 7.9 ㎏のマイクロミニピッグ（すべて雄）4 頭を富士マイクラ株式会社（静岡）より導入した。馴致期間を経てたのち，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 ㎎/㎏ BW のクロシドライトを投与した。PBS に懸濁させたクロシドライト 10ml を動物の右肺もしくは右胸腔内へ投与した。

２）CT 撮像および採血

図 1 マイクロミニピッグ 胸部 CT 撮像．非侵襲的に胸部病態をモニタリングするために、附属動物病院の CT（Canon Medical Systems，Alexion Advance）を用いて被験物質投与個体の CT イメージを取得した。

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。

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス，熊本），メデトミジン塩酸塩（共立製薬，東京）およびミダゾラム（日医工，富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.09 ml/kg）で鎮静，挿管処置を施した後，2－5%イソフルラン（ヴィアトリス製薬，東京）麻酔下で Alexion Advance 16 列 CT（Canon Medical Systems）で 胸部 CT イメージを獲得した。麻酔管理下の過剰換気により自発呼吸を停止させ，管電圧 120 k V，仰臥位，スライス厚 1.0 mm の条件下で非造影 CT イメージを取得した。

同時に麻酔下のマイクロミニピッグの頚静脈から血液を採取し，血液検査を実施した。採取した血液の一部を遠心分離し，生化学検査等のための血清サンプルとした。

撮影後は、アチパメゾール塩酸(0.02～0.04mg/㎏)を投与し、覚醒を確認した。

３）投与方法

麻酔の覚醒時における事故防止のため，絶食させたマイクロミニピッグに対して，MMB の鎮静の後，速やかに気管挿管処置を実施した。イソフルランでの麻酔下で気管支鏡（TOKIBO，東京）を用いて、クーデック気管支ブロッカーチューブ（大研医器株式会社，大阪）を装着し，右肺に被験物質を投与した。

なお，被検物質の投与時には，実験者の暴露を避けるため，N95 マスク，ゴーグル，帽子，ガウンを使用した。投与後，速やかに覚醒させ，3 日間は責任実験者以外，動物との接触を禁止した。

図 2 マイクロミニピッグへの被験物質投与．ブロッカーチューブを用いて被験物質を投与した。投与に際しては術者への石綿が暴露されないよう十分な対策を施した。

４）解剖およびサンプリング

3 か月の観察の後、岐阜大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。安楽殺処置として、前述の MMB で鎮静処置（0.09 ml/kg）した後，チオペンタール（ニプロ ES ファーマ，大阪）を静脈より投与（10 mg/kg<）した。チオペンタールによる深麻酔が得られたことを確認し、15% KCl（丸石製薬，大阪）の投与により心停止させた。

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、肺を摘出した。摘出後，速やかに臓器の温度を下げるため、4℃に冷却してある D-PBS（富士フイルム和光純薬、

大阪）を左右の気管支より洗浄瓶を用いて肺全体が膨らむ程度（各約 200 ml）注入し、on ice にて 10 分程度臓器の温度を低下させた。左肺は対照部位として、右肺は病変部位を中心に約 5 mm 厚で切り出しを実施した。

分子生物学的解析用には、正常対照部位として、左後葉の 3 領域（領域 A,B 及び C）を採取した。領域 A は臓側/壁側胸膜＋肺胞領域（胸膜と肺胞 under2mm 程度を残す）、領域 B は細気管支＋肺胞＋隔壁（領域 A から内部に 10mm 程度）、領域 C は BVB＋静脈（肺スライスの中心部に陣取る脈管＋気管支をくり抜いて）とした。病変部では、右後葉を個体ごとの病変の状況に応じて 1 領域から 3 領域を採取した。

病理組織学的解析用として、左肺は対照部位として、右肺はシングルセル解析用サンプルと対面で切り出した肺を、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて室温にて 48−72 時間浸漬固定した。

５）ホルマリン固定パラフィンブロック作製

その後、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm×2 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに 6 時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン（株）製 VIP-6AI）を用いて 100%エタノールI〜VII、クロロホルムI〜III、パラフィンI〜IVを各 1 時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。

パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトーム REM-710, 大和光機株式会社）にて約 3〜4 μm 厚で薄切して FFPE 病理切片を作製した。スライドガラスは松浪 FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは MUTO PURE CHEMICALS 社製を使用した。

６）各種染色法

H&E 染色およびベルリンブルー染色を実施した。

H&E 染色は脱パラフィン、水洗後 2 倍のカラッチヘマトキシリンにて室温 10 分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約 10 分間色出しを実施した。エオジンはエオジン Y を用いたエオジン水溶液にて室温で 3 分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

① 脱パラフィン・水洗
② 2 倍カラッチヘマトキシリン液・・・10 分
③ 水洗
④ 0.5%塩酸/70%アルコール溶液（分別）・・・軽く
⑤ 水洗（色出し）・・・10 分
⑥ 70%エタノール・・・1 分
⑦ エオジン水溶液・・・3 分
⑧ エタノールI〜VII（脱水・分別）
⑨ キシレンI〜VII（透徹）・・・各 1 分
⑩ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

ベルリン青染色は脱パラフィン・水洗後、蒸留水にて 3 回洗浄し、ベルリン青染色で室温 20 分染色した。蒸留水を用いてベルリン青染色液を洗浄後、ケルンエヒトロート液にて室温 5 分核染色し、軽く水洗した後、脱水、透徹を行った。封入剤はマリノール（武藤化学株式会社）を用いた。

① 脱パラフィン・水洗
② 蒸留水・・・3 回
③ ベルリン青染色液・・・20 分
④ 蒸留水・・・3 回
⑤ ケルンエヒトロート液・・・5 分
⑥ 水洗・・・軽く
⑦ エタノールI〜IV（脱水）・・・各 1 分
⑧ キシレンI〜III（透徹）・・・各 1 分
⑨ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

3. 倫理面への配慮

本実験は、岐阜大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（AG-P-N-20240060）。動物福祉に配慮した実験となるように、本実験は日本実験動物医学専門医協会が認定する実験動物医学専門医（認定第 204 号）の指導の下で実施された。

また、実験を開始する前に、本研究の詳細を関連する学生・スタッフに説明した。説明を理解し、了承した者のみを研究に参加させた。説明会において、研究に参加しない選択をしてもなんら不利益は生じないことを確認した。

図 3 実験説明会．実験参加者の安全対策を十分に取ることや、それでも残される実験のリスクを学生やスタッフへ説明し、安全のみならず安心にも配慮した実験を計画した。

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

１）マイクロミニピッグの肺を用いた解析

岐阜大学にて飼育している、マイクロミニピッグ 3 頭由来の正常肺検体を用い、中皮細胞の濃縮方法と 1 細胞 RNA-seq 解析方法の検討を実施した。

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。(2)の検体はごく微量であるため、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 1)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。残りの 2 頭由来の検体については、最初の 1 頭とことなり、摘出肺表面になるべく触れずに(=胸膜の傷つけを最小限として)検体を採取し、すべての検体について CELLBANKER 1 で検体を凍結保存し、得た細胞懸濁液から磁気分離により CD45 または CD31 陽性細胞と陰性細胞に分離したあと 1:1 で混合し、TAS-Seq2 法により 1 細胞 RNA-seq 解析を行った。

(1) の検体の内訳は、A0954: 肺臓側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）、A0955: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER2（無血清タイプ）、A0962: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：STEM-CELLBANKER GMP grade（無血清ハイグレードタイプ）、A0963: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER1（血清タイプ）、・A0964: 壁側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）である。

(2) の検体の内訳は、臓側または肋骨側、表層中皮剥離組織または胸膜組織、保存液はすべて CELLBANKER 1 である。

得られた 1 細胞 RNA-seq データのクラスタリング解析を行い、中皮細胞クラスターを、他生物種で知られている特徴的なマーカー遺伝子(CST6, UPK1B, ALOX15, ENSSCG00000008001(MSLN), CLDN15, SERPINE3)の発現により同定し、その含有割合を評価し、それぞれの検体取得方法が中皮細胞取得と解析に適しているかを検討した。

２）ブタとヒトの胸膜細胞における 1 細胞解析結果比較

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。細胞種のマーカー遺伝子の発現パターンより、細胞の種類の特定を行った。５症例のブタ胸膜の 1 細胞 RNA-seq データは、実験的に取得した A0954: 肺臓側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）、A0955: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER2（無血清タイプ）、A0962: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：STEM-CELLBANKER GMP grade（無血清ハイグレードタイプ）、A0963: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER1（血清タイプ）、・A0964: 壁側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）を統合して解析を行った。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。

（倫理面への配慮）

本研究で使用したヒト胸膜データは全て公共データベースより取得したデータであり、患者個人情報に結びつくものは無く、個人の人権、利益に支障を及ぼさない手続きがなされている。

C．研究結果

課題 1. マイクロミニブタを用いた動物実験（3 ヶ月）

１）被検動物のモニタリング

被検物質を投与した動物の一般状態は獣医師により観察され，定期的に CT 撮像ならびに血液検査によって病態が評価された。

石綿を胸腔内へ投与した個体は、投与後 3 日前後まで食欲不振、活動量の低下を示した。被験物質投与に伴う気胸（図 4 胸部 CT 画像参照）が原因であると判断し、体調が回復するまで動物の観察を続けた。

投与後の一時的な元気消失が過ぎると、発咳も治まった。体調を回復したのち被検動物は臨床的な異常を示さなかった。3 か月の実験期間を通じて体重の減少は認められなかった。

２）CT イメージ

石綿投与 3 か月のモニタリング実験において、被験物質投与前、投与後 3 日、4 週間、３ヶ月（解剖前）の CT 撮像を実施した。

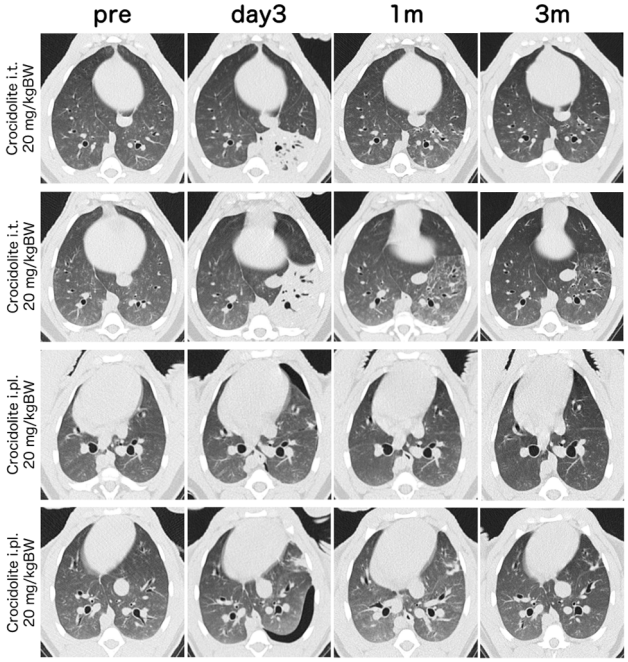

図 4　４頭のマイクロミニピッグにおける胸部 CT 画像．投与前、投与 3 日後、投与１ヶ月後、投与３ヶ月後に際して、全身麻酔条件下にて胸部 CT を撮影した。上段 2 つは気管支内投与個体であり、下段 2 つは胸腔内投与個体。

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。

3)病理組織学的観察

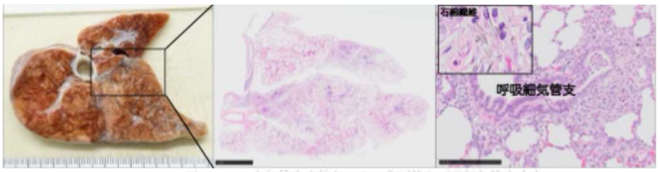

図５ クロシドライトの右気管支内投与による典型的な呼吸細気管支病変

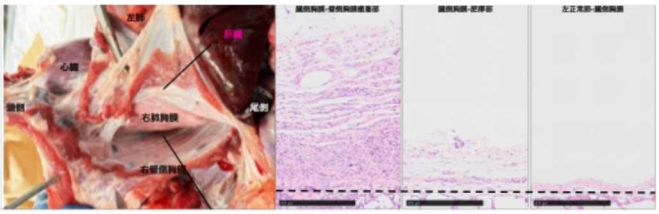

図 6 クロシドライトの胸腔内投与による典型的な胸膜病変

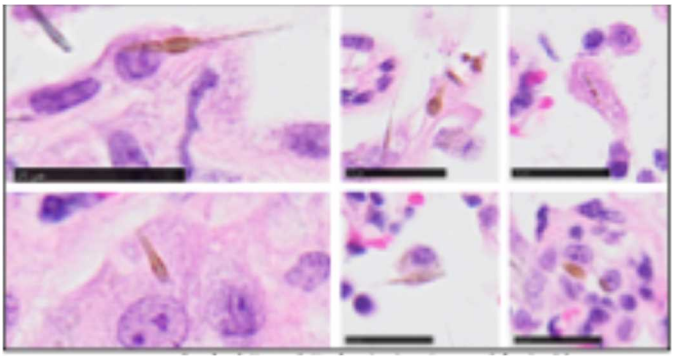

図 7 病変部に観察された石綿小体

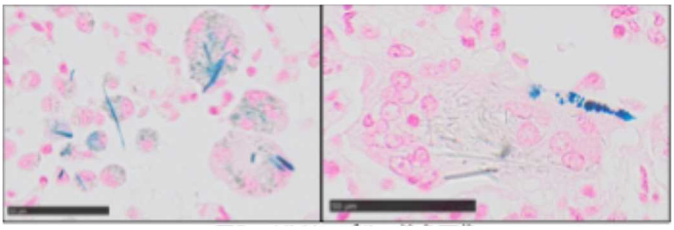

図 8 ベルリンブルー染色

本年度、まず動物実験のための石綿として、特注の長線維長のクロシドライトを用いることとし、投与濃度を検討した。投与可能な高濃度を検討した結果、PBS に懸濁可能な物理的最高濃度として、20 mg/ml であることを確認した。そこで、予備検討として特注長線維長のクロシドライトについて、20 mg/kgBW の用量（投与懸濁液としては 20 mg/ml PBS）で右気管支内投与２頭、胸腔内投与２頭の合計４頭の動物実験を実施した。実験は、単回投与後３ヶ月観察を行い、実験最終日に解剖を行うと共に、胸腔臓器についてサンプリングを実施した。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（図 5）。

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（図 6）。

加えて、本年度の研究で分かったこととして、肺内及び胸腔内の病変において、一部の石綿線維に鉄の付着が観察された事から、石綿小体の形成は３ヶ月で生成され始めることが明らかとなった（図 7）。

そこでより詳細に検討するため、ベルリンブルー染色を実施した結果、HE 標本にて形態的に鉄タンパク質の沈着が不明な線維に対しても、既にベルリンブルー陽性の反応がみられ、鉄タンパク質の付着が一部の石綿線維で開始していることが示唆された（図 8）。

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

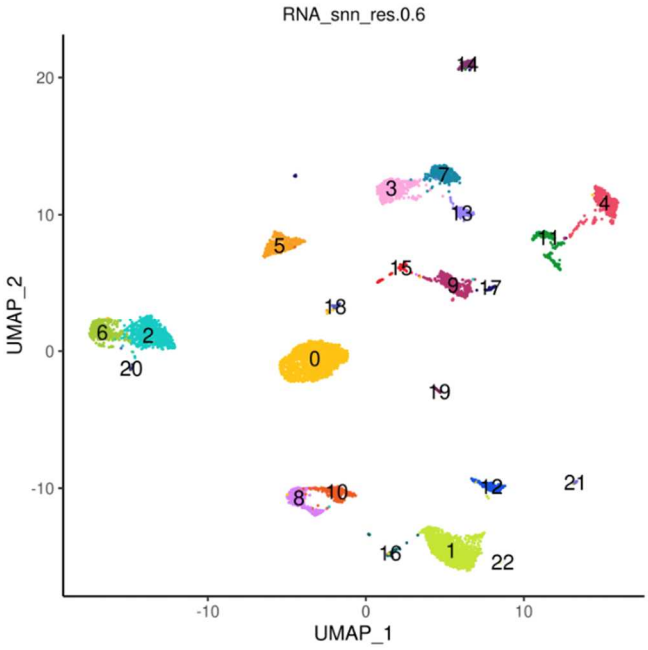

図 9 胸膜剥離および胸膜下組織の 1 細胞 RNA-seq データのクラスタリング解析

図9に示すように、ブタ胸膜下組織および胸膜剥離組織の1細胞RNA-seqデータをUMAPに示した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、クラスター5が

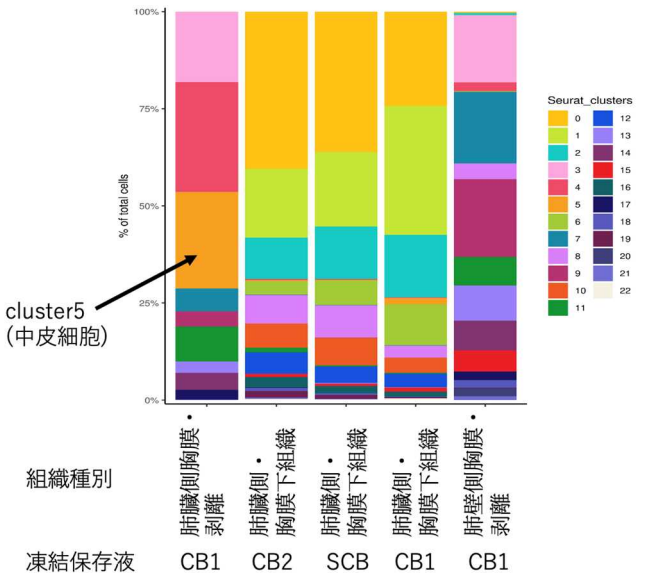

図 10 条件間での細胞構成比の違い

中皮細胞であることが見出された。条件間での細胞構成比を図10に示す。これより、臓側胸膜剥ぎ取り組織が最も中皮細胞を含んでいる一方、その他の組織は含有量がすくないこと、また凍結保存液の影響は大きくないが、CELLBANKER1で保存した胸膜下組織が最も中皮細胞を含んでいることが見出された。

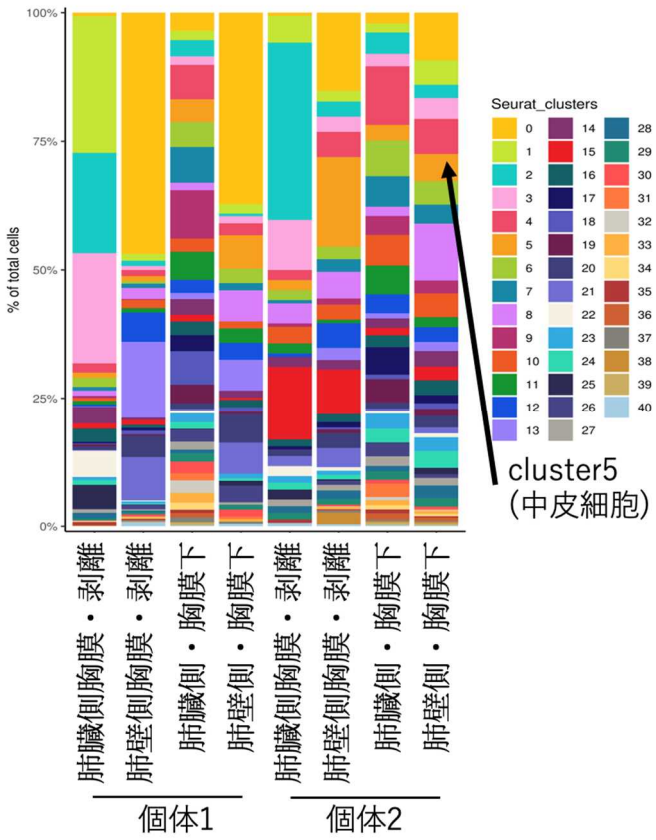

図 11 別個体での細胞構成比の検証

図11に、2頭のブタ肺において同様に検体採取の手法の違いに応じた細胞構成比の違いを示す。
CD45またはCD31陽性細胞の含有量を減らし。Double negative細胞と1:1で混合することで、2個体の胸膜下組織のいずれにおいても中皮細胞(cluster5)が充分量検出された。また、胸膜剥離組織は、採取部位の違いにより細胞構成が大きく異なることが見出された。異なる個体における細胞改修の再現性という観点では、胸膜下切り出し組織のほうが優れていることも見出された。

本年度、ブタ胸膜から採取した細胞の1細胞RNA-seqデータとヒト胸膜1細胞RNA-seqデータの比較解析を行った。図12Aに示すように、ヒト胸膜1細胞RNA-seqデータをUMAPに示した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、ヒト中皮細胞のクラスターを特定した。同様の解析をブタ胸膜から採取した細胞を用いた1細胞RNA-seq解析においても実施した（図12B）。遺伝子の発現パターンから、0～22の23種類の細胞クラスターに分類した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、クラスター５がブタ中皮細胞であることを特定した。ヒトとブタのデータセットを用いて、それぞれの中皮細胞で選択的に発現している遺伝子群の抽出を行った。ヒト中皮細胞クラスターでは、925遺伝子が、ブタ中皮細胞クラスターでは、1907遺伝子が特徴的に発現していることが分かった。さらに、それらのうち、257遺伝子がヒトとブタの中皮細胞において、共通して発現していることを確認した（図12C）。それらの遺伝子の中で、特に中皮細胞において特異的に発現している遺伝子を例としてブタデータセットのUMAP上に示した（図12D）。

D．考察

令和 6 年には前例のない「石綿をブタ肺（胸腔）へ投与する」実験を完遂できた。当初、どのような臨床経過を辿るか分からない不安、途中死亡しないかなどの不安もあったが、3 か月のモニタリングを完遂できた。これらのブタ肺病理切片について、労働者の石綿肺の病理診断経験が豊富な埼玉県立循環器呼吸器病センター病理診断科の河端美則先生とそれぞれ病理所見について議論をした結果、肺内投与による病変分布が実臨床に酷似しており、ブタは労働者に類似する石綿関連疾患、特に石綿肺の発症-進展が評価可能となる事に期待できると共に、今後炎症が遷延化する事で、石綿肺の Grade3 相当以上の病変へ進展することが期待されるとの意見を頂いた。

これまでに、齧歯類を用いた石綿線維の肺内への投与実験は精力的に実施されてきた。我が国においては、産業医大森本泰夫教授らの研究グループが現在までにおいて最も精力的に肺疾患の実験研究を実施しており、結晶質シリカ、man-made mineral fiber、アスベスト、ナノマテリアル等をラットの肺内に統一した投与量で投与し、肺臓器の有害性について評価されてきた。クリソタイルをラットに投与した肺病変では、アクリル酸ポリマーや結晶質シリカの投与時と同様に好中球性の急性炎症が生じ、その後炎症が持続する事が報告されており（Nishida C and Morimoto Y. Particle and Fibre Toxicology 2022）、いずれの化学物質による肺疾患もラットでは画一的な組織変化を示し、労働者における珪肺または石綿肺などの組織病理学的多様性は、ラットでの再現は困難であると考えられる。以上のこれまでの齧

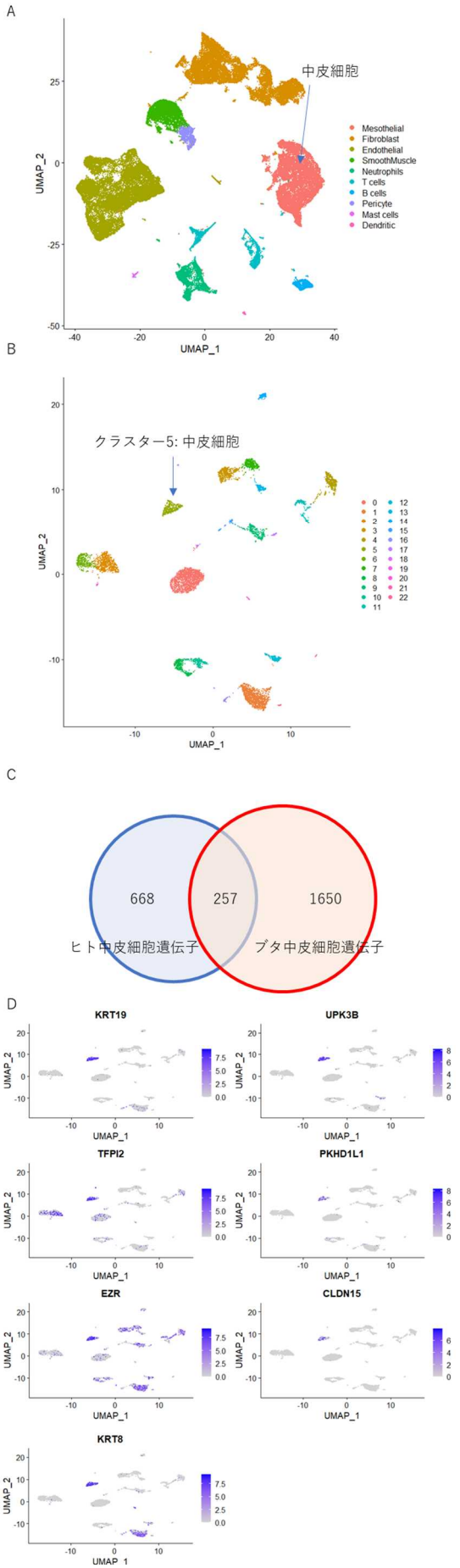

図 12 ヒトとブタ中皮細胞 1 細胞 RNA-seq の比較解析

歯類を用いた結果と比較しても、ブタで今回観察された病理組織学的変化は、労働者の病態を細胞及び組織レベルでより反映したモデル開発であることが示唆された。

マイクロミニピッグの肺及び胸膜を用いた1細胞RNA-seq解析を行うための実験系の確立実験においては、外科的に中皮細胞が濃縮されている領域(胸膜下組織)を切り出し、また組織中に多く含まれるCD45陽性血球系細胞。CD31陽性内皮細胞の含有量を人為的に減らすことで、ブタ肺中皮細胞を十分な数1細胞RNA-seq解析により解析可能となることが見出された。本検体採取・処理手法を、石綿投与ブタ検体に適用することで、石綿関連疾患ブタモデルの詳細な1細胞RNA-seq解析(中皮細胞だけでなく、周囲の間質細胞や血球系細胞も含んだプロファイリングや、細胞間相互作用解析、細胞分化系譜解析など)が可能になることが期待される。

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、石綿による傷害により、それらのマーカー遺伝子の発現パターンが変化することが予想される。また、石綿傷害胸膜と正常の胸膜の中皮細胞の比較解析を行うことで、石綿によって生じる細胞へのダメージの詳細な分子メカニズムの解明が期待できる。

E．結論

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。

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。

G．研究発表

1. 論文発表

1) 岸本卓巳, 岡本賢三, **山野荘太郎**, 梅田ゆみ, 武田知起, 加藤勝也, 河村哲治. 有機粉じんによる新たなじん肺. 呼吸器内科 45(5) 511-515 2024.
2) Kasai T, Hirai S, Furukawa Y, Misumi K, Takeda T, Goto Y, Takanobu K, Yoneyama K, **Yamano S**, Senoh H, Umeda Y. Lung carcinogenicity by whole body inhalation exposure to Anatase-type Nano-titanium Dioxide in rats. J Toxicol Sci. 2024;49(8):359-383. doi: 10.2131/jts.49.359.
3) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A,

Rittinghausen S, **Yamano S**. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. J Toxicol Pathol. 2025 Apr;38(2):113-129. doi: 10.1293/tox.2024-0071.

4) Hano, K., Takashima, S., Inatani, Y., Kainuma, R., Oiji, Y., Nakamura, K., Yayota, M. and **Takasu, M**.: Ovarian dynamics in progesterone tablet-induced superovulation in goats assessed by magnetic resonance imaging. Anim. Sci. J. 95: e13914, 2024.
5) Inage, Y., Fujimori, K., **Takasu, M**., Matsui, K., Kinoshita, Y., Morimoto, K., Koda, N., Yamamoto, S., Yamanaka, S., Matsumoto, K., Shimada, K., Kuroda, T., Ikeda, A., Inoue, M., Yokoo, T. and Kobayashi, E.: Fetal kidney grafts and organoids from microminiature pigs: Establishing a protocol of production and long-term cryopreservation. Intl. J. Mol. Sci. 25: 4793, 2024.
6) Endo, S., Morikawa, Y., Suenami, K., Sakai, Y., Abe, N., Matsunaga, T., Hara, A. and **Takasu, M**.: Involvement of porcine and human carbonyl reductases in the metabolism of epiandrosterone, 11-oxygenated steroids, neurosteroids, and corticosteroids. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 243: 106574, 2024.
7) Ando, A., Matsubara, T., Suzuki, S., Imaeda, N., **Takasu, M**., Shigenari, A., Miyamoto, A., Ohshima, S., Kametani, Y., Shiina, T., Kulski, J. K., and Kitagawa, H.: Genetic links between reproductive traits and amino acid pairwise distances of swine leukocyte antigen alleles among mating partners in Microminipigs. Intl. J. Mol. Sci. 25: 7362, 2024.
8) Matsubara, T., Fukatsu, R., Yamamoto, M., Moriya, M., Hano, K., Nakamura, K., Ohba, Y. and **Takasu, M**.: Assessment of horse behavior using an activity monitoring device used for cats and dogs. J. Equine Sci. 35: 47-55, 2024.
9) Yoshihara, T., Tozaki, T., Nakaya, S., **Takasu, M**., Kawate, K., Furukawa R., Kikuchi, M., Ishige, T., Nagata, S., Kakoi, H., Hobo, S.: Genetic characterization of phenotypic traits in endangered Taishu horse breed and their breeding strategy. J. Equine Vet. Med. 144: 105233, 2025.
10) Hisaeda, K., Ono, T., Shimokawa-Miyama, T., Hata, A., Iwata, E., Hiasa, Y., Ohzawa, E., Tozaki, T., Murase, H., **Takasu, M**., Nishii, N. and Kitagawa, H.: Differences in serum iron concentrations between the summer and winter in Noma horses. J. Equine Sci. 36: 1-9, 2025.
11) Miyake K, Ito J, Takahashi K, Nakabayashi J, Brombacher F, **Shichino S**, Yoshikawa S, Miyake S, Karasuyama H. Single-cell transcriptomics identifies the differentiation trajectory from inflammatory monocytes to pro-resolving macrophages in a mouse skin allergy model. Nat Commun. 2024 Feb 23;15(1):1666. doi: 10.1038/s41467-024-46148-4.
12) Enomoto T, Shirai Y, Takeda Y, Edahiro R, **Shichino S**, Nakayama M, Takahashi-Itoh M, Noda Y, Adachi Y, Kawasaki T, Koba T, Futami Y, Yaga M, Hosono Y, Yoshimura H, Amiya S, Hara R, Yamamoto M, Nakatsubo D, Suga Y, Naito M, Masuhiro K, Hirata H, Iwahori K, Nagatomo I, Miyake K, Koyama S, Fukushima K, Shiroyama T, Naito Y, Futami S, Natsume-Kitatani Y, Nojima S, Yanagawa M, Shintani Y, Nogami-Itoh M, Mizuguchi K, Adachi J, Tomonaga T, Inoue Y, Kumanogoh A. SFTPB in serum extracellular vesicles as a biomarker of progressive pulmonary fibrosis. JCI Insight. 2024 Jun 10;9(11):e177937. doi: 10.1172/jci.insight.177937.
13) Iwata A, Maruyama J, Natsuki S, Nishiyama A, Tamura T, Tanaka M, **Shichino S**, Seki T, Komai T, Okamura T, Fujio K, Tanaka M, Asano K. Egr2 drives the differentiation of Ly6Chi monocytes into fibrosis-promoting macrophages in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice. Commun Biol. 2024 Jun 3;7(1):681. doi: 10.1038/s42003-024-06357-5.
14) Taketomi Y, Higashi T, Kano K, Miki Y, Mochizuki C, Toyoshima S, Okayama Y, Nishito Y, Nakae S, Tanaka S, Tokuoka SM, Oda Y, **Shichino S**, Ueha S, Matsushima K, Akahoshi N, Ishii S, Chun J, Aoki J, Murakami M. Lipid-orchestrated paracrine circuit coordinates mast cell maturation and anaphylaxis through functional interaction with fibroblasts. Immunity. 2024 Aug 13;57(8):1828-1847.e11. doi: 10.1016/j.immuni.2024.06.012.
15) Enomoto T, Takeda Y, Shirai Y, Hasegawa T, Zhao F, Lunding H, Pohl M, Edahiro R, **Shichino S**, Kawasaki T, Yoshimura H, Hara R, Amiya S, Yamamoto M, Nakatsubo D, Tanizaki S, Nakayama M, Noda Y, Niitsu T, Adachi Y, Tone M, Abe Y, Naito M, Masuhiro K, Naito Y, Shiroyama T, Miyake K, Koyama S, Fukushima K, Iwahori K, Hirata H, Nagatomo I, Nojima S, Yanagawa M, Inoue Y, Kumanogoh A. Serum C-C motif chemokine ligand 17 as a predictive biomarker for the progression of non-idiopathic pulmonary fibrosis interstitial lung disease. Respir Res. 2025 Apr 23;26(1):157. doi: 10.1186/s12931-025-03237-2.
16) Nagao Y, Yokoi A, Yoshida K, Kitagawa M, Asano-Inami E, Kato T, Ishikawa M, **Yamamoto Y**, Kajiyama H. "Uterine leiomyosarcoma cell-derived extracellular vesicles induce the formation of cancer-associated fibroblasts." BBA - Molecular Basis of Disease, 1870(4):167103. (2024)
17) Uehara T, Matsuzaki J, Yoshida H, Ogawa Y, Miura J, Fujimiya H, **Yamamoto Y**, Kawauchi J, Takizawa S, Yonemori K, Sakamoto H, Kato K, Ishikawa M, Ochiya T. "Potential utility of pretreatment serum miRNAs for optimal treatment selection in advanced high-grade serous ovarian cancer." Jpn J Clin Oncol, 54(8):917-925. (2024)
18) Prieto-Vila M, Yoshioka Y, Kuriyama N, Okamura A, **Yamamoto Y**, Muranaka A, Ochiya T. "Adult cardiomyocytes-derived EVs for the treatment of cardiac fibrosis." J Extracell Vesicles, 13(7):e12461. (2024)
19) Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, **Yamamoto Y** & Ochiya. "Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression." Cell Reports, 43(8):114517. (2024)
20) Shibata M, Yoshida K, Yokoi A, Suzuki H, **Yamamoto Y**, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yasui Y, Nishiko Y, Yoshihara M, Tamauchi S, Yoshikawa N, Nishino K, Yamamoto E."Elucidation of the role of XBP1 in the progression of complete hydatidiform mole to invasive mole through RNA-seq."Gynecologic Oncology,190:189-199. (2024)

21) Suzuki K, Yokoi A, Matsuzaki J, Yoshida K, **Yamamoto Y**, Kato T, Ishikawa M, Ochiya T, Kajiyama H. “Circulating serum miRNAs predict response to platinum chemotherapy in high-grade serous ovarian cancer.” Cancer medicine, 13(22):e70251. (2024)
22) Nakamichi K, Suzuki H, **Yamamoto Y**, Semba K, Nakayama J. “Nuclear receptor profiling for subtype classification and as prognostic markers in 33 cancer types.” Discover Oncology, 24;15(1):834. (2024)
23) Yoshihara K, Ito K, Kimura T, **Yamamoto Y**, Urabe F. “Single-cell RNA sequencing and spatial transcriptome analysis in bladder cancer: Current status and future perspectives.” Bladder cancer (Amsterdam, Netherlands), 21;11(1):23523735251322017. (2025)
24) Yamamoto T, Urabe F, Yoshioka Y, **Yamamoto Y**, Ochiya T. “Protocol for extracellular vesicle secretion-related gene screening via ExoScreen technique.” STAR protocols, 21;6(1):103569. (2025)
25) Yoshida K, Yokoi A, Suzuki H, Tamauchi S, Kitagawa M, Inami E, Nakayama J, Mori Y, Okamoto K, Suzuki Y, Yoshida H, Kato T,Kajiyama H, **Yamamoto Y**. ”Single-Nucleus RNA Sequencing and Spatial Transcriptomics for Squamous Cell Carcinoma Arising From Ovarian Mature Teratoma.” Cancer science, Online ahead of print. (2025)
26) Harada K, Sakamoto N, Kitaoka T, Nakamura Y, Kondo R, Morisue R, Hashimoto H, **Yamamoto Y**, Ukai S, Maruyama R, Sakashita S, Kojima M, Tanabe K, Ohdan H, Shitara K, Kinoshita T, Ishii G, Yasui W, Ochiai Y, Ishikawa S. “PI3 expression predicts recurrence after chemotherapy with DNA-damaging drugs in gastric cancer.” The Journal of pathology,265(4) 472-485. (2025)
27) Xian W, Wang S, Xie J, **Yamamoto Y**, Khorrami M, Zhang Y, Montes RC, Desales C, Khorrami M, Mory Z, Hoffman A, Su A, Nguyen C, Davies PJA, Stephan C, Pan S, Wu W, Liu Y, Siegelman J, Waters RE, Ross WA, Song S, Metersky M, Beer DG, Crum CP, Stewart AJ, Vincent M, Russell R, Izard RA, Ho KY, Hung-Sen Lai J, Bachovchin WW, Ajani JA, McKeon FD. “Evolution of Esophageal Adenocarcinoma from Precursor Lesion Stem Cells.”Gastroenterology, 14:S0016-5085(25)00521-9. (2025)

2．学会発表

1) **山野荘太郎**、梅田ゆみ. ブタを用いた職業性肺疾患研究の基盤構築. 第 97 回　日本産業衛生学会. 広島
2) 後藤裕子、武田知起、**山野荘太郎**. 気管内投与したフラーレンナノウィスカーのラット肺内での形態変化と毒性影響. 第 3 回環境化学物質合同大会. 広島
3) **山野荘太郎**、梅田ゆみ. 化学物質により誘発される齧歯類の肺病変における回復性. 第51回日本毒性学会学術年会. 福岡
4) **山野荘太郎**、梅田ゆみ. 粒子状化学物質の呼吸器毒性評価におけるブタの有用性. 第41回エアロゾル科学・技術研究討論会. 東京
5) **山野荘太郎**、梅田ゆみ. ブタを用いた肺疾患研究プラットフォームの創設. 日本肺サーファクタント・界面医学会 第 60 回学術研究会. 福岡
6) **山野荘太郎**. 大型動物を用いた職業性肺疾患研究の高度化. 第 72 回日本職業・災害医学会学術大会. 東京
7) 山本樹、青木清乃、高野洋志、山本采佳、**山野荘太郎**、大島正伸、八尾良司、渡邊利雄、田中知明、大木理恵子. p53 標的遺伝子 p53PAD5 は腸管上皮細胞にストレス抵抗性を付与することで放射線耐性を増強させる. 第 47 回日本分子生物学会年会. 福岡
8) **山野荘太郎**. 職業性肺疾患の研究に最適な動物とは？ 令和 6 年度 NHO 近畿中央呼吸器センター学術講演会. 大阪
9) **山野荘太郎**、梅田ゆみ. 偶蹄類と先進医学解析技術を駆使したバイオエアロゾルの健康影響評価新機軸の開拓. 第 16 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 大阪
10) 加藤大輝、宮崎正道、杷野一輝、泉満里愛、トーパイン、**高須正規**. マイクロミニピッグにおける非侵襲的な卵子採取法の開発. 第 167 回 日本獣医学会．258，帯広
11) 杷野一輝、青山忠義、**高須正規**．補助生殖医療システムの開発における工学と獣医学のインタラクション．第 167 回 日本獣医学会．259，帯広
12) 杷野一輝、坂本裕太郎、髙島諭、**高須正規**. ドライケミストリーカートリッジを用いたマイクロブタの血中プロゲステロン濃度測定. 第 167 回 日本獣医学会．265，帯広
13) 泉満里愛、田中都、越智梢、菅波孝祥、関あずさ、平田暁大、 加藤大輝、杷野一輝、森羽純、**高須正規**．ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマイクロミニピッグの作出．第 167 回 日本獣医学会．334，帯広
14) Miki, N., Ota, T., **Takasu, M**. and Kanno, Y. Implantable Hemofiltration Microfluidic Device for Hybrid Renal Replacement Therapy. The 15th Japan-China-Korea Joint Conference on MEMS/NEMS, 2024 ChengdMiki, N., Ota, T., Takasu, M. and Kanno, Y. Implantable Hemofiltration Device for Hybrid Renal Replacement Therapy. 69th ASAIO annual conference 2024 Baltimore
15) **Shigeyuki Shichino**. TAS－Seq2 is a sensitive cDNA amplofication system for single-cell RNA-seq. Biology of Genomes, Cold Spring Harbor Laboratory, ポスター, 2024/5/7-12.
16) **Shigeyuki Shichino**. Development of STomics+TAS-Seq method for highly-sensitive,unbiased spatial transcriptomics. Adovancement of STOmics and Single Cell Technologies Forum 2024, 京都大学, 招待講演, 2024/5/30.
17) Bin Wu, **Shigeyuki Shichino**, Satoshi Ueha, Toshihiro Ito, Kouji Matsushima. Unraveling lung epithelial cell injury and fibrosis: a robust ex vivo culture model for investigating molecular interactions and diseases pathogenesis. 第 45 回日本炎症・再生医学会, 福岡国際会議場, ポスター, 2024/7/17.

18) Munetomo Takahashi, Mikiya Tsunoda, **Shigeyuki Shichino**, Shumpei Ishikawa, Kouji Matsushima, Satoshi Ueha. LAG-3 blockade reactivates the CD8+ T cell expansion program to re-expand contracted clones in the tumor. 第 53 回日本免疫学会学術集会, 出島メッセ長崎, 口頭・ポスター, 2024/12/3-5.
19) 平野 悠太, 鈴木 公基, 中山 淳, 山元 智史, 荒屋 潤, 藤田 雄, 山本 雄介. シングルセルメタ解析によって明らかとなった肺腺癌と肺扁平上皮癌における繊維芽細胞の特性. 日本癌学会総会. 83 回 E-1018 2024 年 9 月
20) 中山 淳, 都倉 桃子, 山本 雄介. 浸潤性小葉がんにおける空間遺伝子発現と細胞特性の解明. 日本癌学会総会 83 回 P-1105 2024 年 9 月
21) 田村 貴明, 山元 智史, 木暮 暁子, 吉岡 祐亮, 山本 雄介, 坂本 信一, 市川 智彦, 落谷 孝広. 転移性前立腺癌に教育された破骨細胞由来細胞外小胞は骨転移巣で腫瘍進展・骨破壊を促進する. 日本癌学会総会 83 回 P-2163 2024 年 9 月
22) 鈴木 一弘, 横井 暁, 吉田 康将, 北川 雅美, 長尾 有佳里, 北井 美穂, 須藤 保, 山本 雄介, 梶山 広明, 横井 暁. 卵巣癌プラチナ抵抗性の克服に向けた細胞外小胞関連 JAK/STAT 経路解析. 日本癌学会総会 83 回 J-3003 2024 年 9 月
23) 吉原 健太郎, 占部 文彦, 鈴木 公基, 木村 高弘, 山本 雄介. 膀胱癌 En Bloc 切除標本の空間トランスクリプトーム解析による浸潤機構の解明. 日本癌学会総会 83 回 P-3250 2024 年 9 月
24) 植草 良輔, 横井 暁, 北川 雅美, 吉田 康将, 松崎 潤太郎, 山本 雄介, 梶山 広明, 北川 雅美. がんリキッドバイオプシーの現状と新展開 高異型度漿液性卵巣癌における細胞外小胞関連 DNA を用いた新たな臨床有用性の検討. 日本癌学会総会 83 回 S20-6 2024 年 9 月
25) 中道 和也, 鈴木 公基, 中山 淳, 山本 雄介, 仙波 憲太郎. 核内受容体発現プロファイルによる診断マーカーおよび治療標的の探索. 日本癌学会総会 83 回 J-3065 2024 年 9 月
26) 鈴木 公基, 吉田 康将, 平野 悠太, 横井 暁, 梶山 広明, 山本 雄介. 高悪性度漿液性卵巣癌における PARP 阻害薬耐性メカニズム解明のための空間トランスクリプトミクスと全エクソームシーケンス. 日本癌学会総会 83 回 E-3059 2024 年 9 月
27) 大嶋 一輝, 松崎 潤太郎, 中山 淳, 山本 雄介, 津川 仁, 加藤 健, 落谷 孝広, 齋藤 義正, 松崎 潤太郎. 血中に存在する細菌由来RNAの肝臓がん発がんに対する影響の解明. 日本癌学会総会 83 回 E-3053 2024 年 9 月
28) 山元 智史, 山本 雄介, 石井 明子, 落谷 孝広. PSAT1 を介した EV 分泌が促進するがん転移機構と転移リスク診断としての有用性の検討. 日本分子腫瘍マーカー研究会 44 回 2024 年 9 月
29) 大嶋 一輝, 松崎 潤太郎, 中山 淳, 津川 仁, 山本雄介, 加藤 健, 落谷 孝広, 齋藤 義正. 肝臓がん患者における血中循環"細菌由来 RNA"プロファイルの特徴. 日本分子腫瘍マーカー研究会 44 回 2024 年 9 月
30) 都倉 桃子, 椎野 翔, 高山 伸, 首藤 昭彦, 吉田 正行, 谷田部 恭, 山本 雄介. 遺伝子発現解析に基づいた乳がんの腫瘍内細胞不均一性に関する研究. 日本乳癌学会総会 32 回 2024 年 7 月
31) 占部文彦, 占部文彦, 古田昭, 伊藤景紀, 伊藤景紀, 吉原健太郎, 五十嵐太郎, 中山淳, 山本雄介, 木村高弘. シングルセル発現解析によるハンナ型間質性膀胱炎の病態解明. 泌尿器科分子・細胞研究会 33 回 2024 年
32) 東和志, 黒岩由佳, 中道和也, 中山淳, 山本雄介, 仙波憲太郎. 新規浸潤性小葉がんモデル UACC-893 を用いた転移機構の解析. 日本がん転移学会学術集会 33 回 2024 年
33) 中道和也, 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介. 髄外病変を標的とした多発性骨髄腫の 1 細胞メタ解析. 日本がん転移学会学術集会 33 回 2024 年

H.知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

出願番号　：PCT/JP2020/027123
発明者　　：松島綱治・上羽悟史・七野成之・伊藤哲・青木寛泰
発明の名称：ビーズ担体を用いた cDNA 増幅方法
出願人　　：東京理科大学
出願日　　：2020 年 7 月 10 日
取得状況：EP/CN で 2024 年成立

２．実用新案登録

該当なし

３．その他

該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

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開発（240202-02）
分担研究項目：マイクロミニピッグの病理評価

研究分担者　山野荘太郎　労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員

研究要旨

本分担研究は、2 年間の長期観察に先立ちパイロット試験として実施された、石綿線維を単回投与したブタの３ヶ月観察後の肺及び胸腔臓器の病理組織学的変化を検討する目的で実施された。

富士マイクラより導入した 4 頭のマイクロミニピッグ（雄，6-7 kg）を実験に用いた。2 頭のマイクロミニピッグの右肺（気管支内）に、石綿懸濁液を投与した。さらに 2 頭の動物の胸腔内に石綿懸濁液を投与した。投与後 3 か月後に全頭の解剖を実施し、肺及び胸腔の病理組織学的変化を検索した。

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 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。ベルリンブルー染色を実施した結果、鉄タンパク質の付着が一部の石綿線維で開始していることが示唆された。

以上のことから、本年度、これまで前例のなかった「ミニブタへの石綿投与」が実現し、特に肺内投与による病変分布が実臨床に酷似しており、ブタは労働者に類似する石綿関連疾患、特に石綿肺の発症-進展が評価可能となる事に期待できる知見を得た。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。

【研究成果の概要】

A．研究目的

小葉間隔壁ならびに呼吸細気管支を持つブタに石綿を投与しその病態病理を把握すること主目的とし、2年間の動物実験の実施に先立ち、合計4頭のマイクロミニピッグを用いた単回投与３ヶ月観察の動物実験(パイロット試験）を実施した。

B．研究方法

１．石綿投与 3 か月のモニタリング

１）使用動物と投与物質

体重 6.9 から 7.9 kgのマイクロミニピッグ（すべて雄）4 頭を富士マイクラ株式会社（静岡）より導入した。馴致期間を経てたのち，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投与した。PBS に懸濁させたクロシドライト 10ml を動物の右肺もしくは右胸腔内へ投与した。

２）CT 撮像および採血

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。

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス，熊本），メデトミジン塩酸塩（共立製薬，東京）およびミダゾラム（日医工，富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.09 ml/kg）で鎮静，挿管処置を施した後，2－5%イソフルラン（ヴィアトリス製薬，東京）麻酔下で Alexion Advance 16 列 CT（Canon Medical Systems）で 胸部 CT イメージを獲得した。麻酔管理下の過剰換気により自発呼吸を停止させ，管電圧 120ｋＶ，仰臥位，スライス厚 1.0 mm の条件下で非造影 CT イメージを取得した。

同時に麻酔下のマイクロミニピッグの頚静脈から血液を採取し，血液検査を実施した。採取した血液の一部を遠心分離し，生化学検査等のための血清サンプルとした。

撮影後は、アチパメゾール塩酸(0.02～0.04mg/kg)を投与し、覚醒を確認した。

３）投与方法

麻酔の覚醒時における事故防止のため，絶食させたマイクロミニピッグに対して，MMB の鎮静の後，速やかに気管挿管処置を実施した。イソフルランでの麻酔下で気管支鏡（TOKIBO，東京）を用いて、クーデック気管支ブロッカーチューブ（大研医器株式会社，大阪）を装着し，右肺に被験物質を投与した。

なお，被検物質の投与時には，実験者の暴露を避けるため，N95 マスク，ゴーグル，帽子，ガウンを使用した。投与後，速やかに覚醒させ，3 日間は責任実験者以外，動物との接触を禁止した。

４）解剖およびサンプリング

3 か月の観察の後、岐阜大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。安楽殺処置として、前述の MMB で鎮静処置（0.09 ml/kg）した後，チオペンタール（ニプロ ES ファーマ，大阪）を静脈より投与（10 mg/kg<）した。チオペンタールによる深麻酔が得られたことを確認し、15% KCl（丸石製薬，大阪）の投与により心停止させた。

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、肺を摘出した。摘出後，速やかに臓器の温度を下げるため、4℃に冷却してある D-PBS（富士フイルム和光純薬、大阪）を左右の気管支より洗浄瓶を用いて肺全体が膨らむ程度（各約 200 ml）注入し、on ice にて 10 分程度臓器の温度を低下させた。左肺は対照部位として、右肺は病変部位を中心に約 5 mm 厚で切り出しを実施した。

分子生物学的解析用には、正常対照部位として、左後葉の３領域（領域 A,B 及び C）を採取した。領域 A は臓側/壁側胸膜＋肺胞領域（胸膜と肺胞 under2mm 程度を残す）、領域 B は細気管支＋肺胞＋隔壁（領域 A から内部に 10mm 程度）、領域 C は BVB＋静脈（肺スライスの中心部に陣取る脈管＋気管支をくり抜いて）とした。病変部では、右後葉を個体ごとの病変の状況に応じて１領域から３領域を採取した。

病理組織学的解析用として、左肺は対照部位として、右肺はシングルセル解析用サンプルと対面で切り出した肺を、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて室温にて 48-72 時間浸漬固定した。

５）ホルマリン固定パラフィンブロック作製

その後、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm×2 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに 6 時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン（株）製 VIP-6AI）を用いて 100%エタノールⅠ～Ⅶ、クロロホルムⅠ～Ⅲ、パラフィンⅠ～Ⅳを各 1 時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。

パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトーム REM-710，大和光機株式会社）にて約 3～4 μm 厚で薄切して FFPE 病理切片を作製した。スライドガラスは松浪 FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは MUTO PURE CHEMICALS 社製を使用した。

６）各種染色法

H&E 染色およびベルリンブルー染色を実施した。

H&E 染色は脱パラフィン、水洗後 2 倍のカラッチヘマトキシリンにて室温 10 分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約 10 分間色出しを実施した。エオジンはエオジン Y を用いたエオジン水溶液にて室温で 3 分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

① 脱パラフィン・水洗
② 2 倍カラッチヘマトキシリン液・・・10 分
③ 水洗
④ 0.5%塩酸/70%アルコール溶液（分別）・・・軽く
⑤ 水洗（色出し）・・・10 分
⑥ 70%エタノール・・・1 分
⑦ エオジン水溶液・・・3 分
⑧ エタノールⅠ～Ⅶ（脱水・分別）
⑨ キシレンⅠ～Ⅶ（透徹）・・・各 1 分
⑩ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

ベルリン青染色は脱パラフィン・水洗後、蒸留水にて 3 回洗浄し、ベルリン青染色で室温 20 分染色した。蒸留水を用いてベルリン青染色液を洗浄後、ケルンエヒトロート液にて室温 5 分核染色し、軽く水洗した後、脱水、透徹を行った。封入剤はマリノール（武藤化学株式会社）を用いた。

① 脱パラフィン・水洗
② 蒸留水・・・3 回
③ ベルリン青染色液・・・20 分
④ 蒸留水・・・3 回
⑤ ケルンエヒトロート液・・・5 分
⑥ 水洗・・・軽く
⑦ エタノールⅠ～Ⅳ（脱水）・・・各 1 分
⑧ キシレンⅠ～Ⅲ（透徹）・・・各 1 分
⑨ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

3. 倫理面への配慮

本実験は、岐阜大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（AG-P-N-20240060）。動物福祉に配慮した実験となるように、本実験は日本実験動物医学専門医協会が認定する実験動物医学専門医（認定第 204 号）の指導の下で実施された。

また、実験を開始する前に、本研究の詳細を関連する学生・スタッフに説明した。説明を理解し、了承した者のみを研究に参加させた。説明会において、研究に参加しない選択をしてもなんら不利益は生じないことを確認した。

C．研究結果

本年度、まず動物実験のための石綿として、特注の長線維長のクロシドライトを用いることとし、投与濃度を検討した。投与可能な高濃度を検討した結果、PBS に懸濁可能な物理的最高濃度として、20 mg/ml であることを確認した。そこで、予備検討として特注長線維長のクロシドライトについて、20 mg/kgBW の用量（投与懸濁液としては 20 mg/ml PBS）で右気管支内投与２頭、胸腔内投与２頭の合計４頭の動物実験を実施した。実験は、単回投与後３ヶ月観察を行い、実験最終日に解剖を行うと共に、胸腔臓器についてサンプリングを実施した。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（図1）。

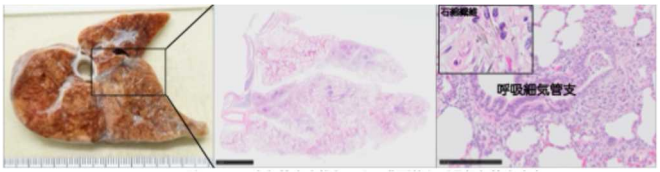

図 1: クロシドライトの右気管支内投与による典型的な呼吸細気管支病変

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（図 2）。

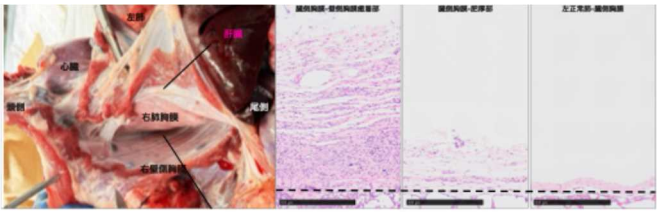

図 2: クロシドライトの胸腔内投与による典型的な胸膜病変

加えて、本年度の研究で分かったこととして、肺内及び胸腔内の病変において、一部の石綿線維に鉄の付着が観察された事から、石綿小体の形成は３ヶ月で生成され始めることが明らかとなった（図 3）。

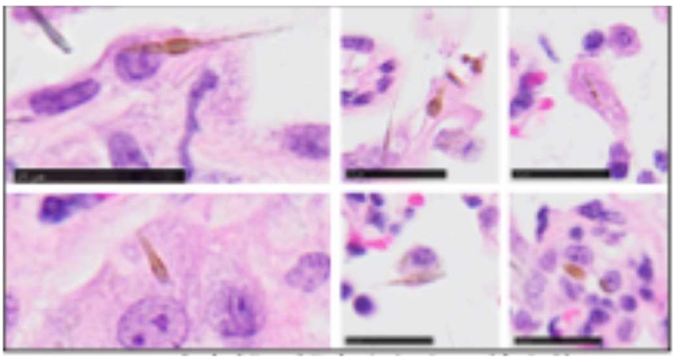

図 3: 病変部に観察された石綿小体

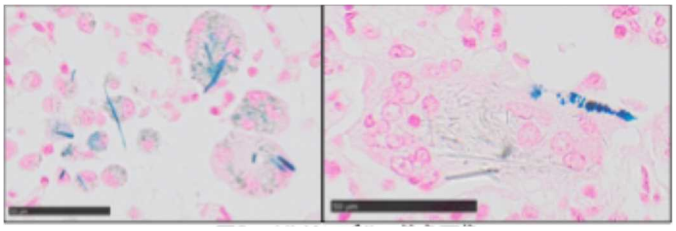

図 4: ベルリンブルー染色

そこでより詳細に検討するため、ベルリンブルー染色を実施した結果、HE 標本にて形態的に鉄タンパク質の沈着が不明な線維に対しても、既にベルリンブルー陽性の反応がみられ、鉄タンパク質の付着が一部の石綿線維で開始していることが示唆された（図 4）。

D．考察

これらのブタ肺病理切片について、労働者の石綿肺の病理診断経験が豊富な埼玉県立循環器呼吸器病センター病理診断科の河端美則先生とそれぞれ病理所見について議論をした結果、肺内投与による病変分布が実臨床に酷似しており、ブタは労働者に類似する石綿関連疾患、特に石綿肺の発症-進展が評価可能となる事に期待できると共に、今後炎症が遷延化する事で、石綿肺の Grade3 相当以上の病変へ進展することが期待されるとの意見を頂いた。

これまでに、齧歯類を用いた石綿線維の肺内への投与実験は精力的に実施されてきた。我が国においては、産業医大森本泰夫教授らの研究グループが現在までにおいて最も精力的に肺疾患の実験研究を実施しており、結晶質シリカ、man-made mineral fiber、アスベスト、ナノマテリアル等をラットの肺内に統一した投与量で投与し、肺臓器の有害性について評価されてきた。クリソタイルをラットに投与した肺病変では、アクリル酸ポリマーや結晶質シリカの投与時と同様に好中球性の急性炎症が生じ、その後炎症が持続する事が報告されており（Nishida C and Morimoto Y. Particle and Fibre Toxicology 2022）、いずれの化学物質による肺疾患もラットでは画一的な組織変化を示し、労働者における珪肺または石綿肺などの組織病理学的多様性は、ラットでの再現は困難であると考えられる。以上のこれまでの齧歯類を用いた結果と比較しても、ブタで今回観察された病理組織学的変化は、労働者の病態を細胞及び組織レベルでより反映したモデル開発であることが示唆された。

E．結論

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。

G．研究発表

1. 論文発表

1) 岸本卓巳, 岡本賢三, 山野荘太郎, 梅田ゆみ, 武田知起, 加藤勝也, 河村哲治. 有機粉じんによる新たなじん肺. 呼吸器内科 45(5) 511-515 2024.

2) Kasai T, Hirai S, Furukawa Y, Misumi K, Takeda T, Goto Y, Takanobu K, Yoneyama K, Yamano S, Senoh H, Umeda Y. Lung carcinogenicity by whole body inhalation exposure to Anatase-type Nano-titanium Dioxide in rats. J Toxicol Sci. 2024;49(8):359-383. doi: 10.2131/jts.49.359.

3) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in

mammals. J Toxicol Pathol. 2025 Apr;38(2):113-129. doi: 10.1293/tox.2024-0071.

2．学会発表

1) 山野荘太郎、梅田ゆみ．ブタを用いた職業性肺疾患研究の基盤構築．第 97 回　日本産業衛生学会．広島
2) 後藤裕子、武田知起、山野荘太郎．気管内投与したフラーレンナノウィスカーのラット肺内での形態変化と毒性影響．第 3 回環境化学物質合同大会．広島
3) 山野荘太郎、梅田ゆみ．化学物質により誘発される齧歯類の肺病変における回復性．第 51 回日本毒性学会学術年会．福岡
4) 山野荘太郎、梅田ゆみ．粒子状化学物質の呼吸器毒性評価におけるブタの有用性．第 41 回エアロゾル科学・技術研究討論会．東京
5) 山野荘太郎、梅田ゆみ．ブタを用いた肺疾患研究プラットフォームの創設．日本肺サーファクタント・界面医学会 第 60 回学術研究会．福岡
6) 山野荘太郎．大型動物を用いた職業性肺疾患研究の高度化．第 72 回日本職業・災害医学会学術大会．東京
7) 山本樹、青木清乃、高野洋志、山本采佳、山野荘太郎、大島正伸、八尾良司、渡邊利雄、田中知明、大木理恵子．p53 標的遺伝子 p53PAD5 は腸管上皮細胞にストレス抵抗性を付与することで放射線耐性を増強させる．第 47 回日本分子生物学会年会．福岡
8) 山野荘太郎．職業性肺疾患の研究に最適な動物とは？ 令和 6 年度 NHO 近畿中央呼吸器センター学術講演会．大阪
9) 山野荘太郎、梅田ゆみ．偶蹄類と先進医学解析技術を駆使したバイオエアロゾルの健康影響評価新機軸の開拓．第 16 回大気バイオエアロゾルシンポジウム．大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

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開発（240202-02）
分担研究項目：マイクロミニピッグを用いた石綿投与実験

研究分担者　高須正規　東海国立大学機構 岐阜大学 高等研究院 准教授

研究要旨

本分担では、マウスやラットとは異なり、ヒトと類似した肺構造をもつミニブタに石綿を投与し、石綿関連疾患モデルミニブタを作製した。令和 6 年は、石綿投与後 3 か月の病態変化をモニタリングすることを主眼とした。

富士マイクラより導入した 4 頭のマイクロミニピッグ（雄，6-7 kg）を実験に用いた。以下に進める石綿の投与に先立ち、高解像度胸部 CT イメージを獲得した。麻酔管理下の過剰換気により自発呼吸を停止させ，管電圧 120 k V，仰臥位，スライス厚 1.0 mm の条件下で非造影 CT イメージを取得した。

2 頭のマイクロミニピッグの右肺（気管支内）に、石綿懸濁液を投与した。イソフルランでの麻酔下で気管支鏡を用い、ブロッカーチューブを装着した片肺換気下で右肺（気管支内）に投与した。さらに 2 頭の動物の胸腔内に被験物質を投与した。麻酔下の動物の肋間に静脈留置針を刺し、懸濁液を投与した。投与後 3 日、1 か月、3 か月に CT を撮像し、その病態を評価した。3 か月のモニタリングの後、被検動物を剖検し、病理組織学的な評価を実施した。胸腔内へ投与した動物は一時的な気胸により体調を崩したが、時間と共に回復した。回復後は体重も緩やかに上昇し、臨床的を示さなかった。

以上のことから、本年度、これまで前例のなかった「ミニブタへの石綿投与」が実現し、石綿関連疾患の病態解明ならびに治療法開発に向けたモデル作製をキックオフできた。

【研究成果の概要】

A．研究目的

石綿暴露によるヒトにおける肺病態を理解するために、小葉間隔壁ならびに呼吸細気管支を持つブタに石綿を投与した。ここでは経時的なモニタリングのため、成体でも30kgに満たないミニブタであるマイクロミニピッグを用いた。

投与後、定期的にCTイメージを獲得し、その病態をモニタリングすることで極めてヒトに類似した石綿マイクロミニピッグを作製し、その病態生理の理解を進めた。

B．研究方法

1．石綿投与 3 か月のモニタリング

1）使用動物と投与物質

体重 6.9 から 7.9 kgのマイクロミニピッグ（すべて雄）4 頭を富士マイクラ株式会社（静岡）より導入した。馴致期間を経てたのち，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投与した。PBS に懸濁させたクロシドライト 10ml を動物の右肺もしくは右胸腔内へ投与した。

2）CT 撮像および採血

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。

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス，熊本），メデトミジン塩酸塩（共立製薬，東京）およびミダゾラム（日医工，富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.09 ml/kg）で鎮静，挿管処置を施した後，2－5%イソフルラン（ヴィアトリス製薬，東京）麻酔下で Alexion Advance 16 列 CT（Canon Medical Systems）で 胸部 CT 画像を撮像した。麻酔管理下の過剰換気により自発呼吸を停止させ，管電圧 120 k V，仰臥位，スライス厚 1.0 mm の条件下で非造影 CT イメージを取得した。

図 1 マイクロミニピッグ 胸部 CT 撮像．非侵襲的に胸部病態をモニタリングするために、附属動物病院の CT（Canon Medical Systems, Alexion Advance）を用いて被験物質投与個体の CT イメージを取得した。

同時に麻酔下のマイクロミニピッグの頚静脈から血液を採取し，血液検査を実施した。採取した血液の一部を遠心分離し，生化学検査等のための血清サンプルとした。

撮影後は、アチパメゾール塩酸(0.02～0.04mg/kg)を投与し、覚醒を確認した。

3）投与方法

麻酔の覚醒時における事故防止のため，絶食させたマイクロミニピッグに対して，MMB の鎮静の後，速やかに気管挿管処置を実施した。イソフルランでの麻酔下で気管支鏡（TOKIBO，東京）を用いて、クーデック気管支ブロッカーチューブ（大研医器株式会社，大阪）を装着し，右肺に被験物質を投与した。

なお，被検物質の投与時には，実験者の暴露を避けるため，N95 マスク，ゴーグル，帽子，ガウンを使用した。投与後，速やかに覚醒させ，3 日間は責任実験者以外，動物との接触を禁止した。

図 2 マイクロミニピッグへの被験物質投与．ブロッカーチューブを用いて被験物質を投与した。投与に際しては術者への石綿が暴露されないよう十分な対策を施した。

4）解剖およびサンプリング

3 か月の観察の後、当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。安楽殺処置として、前述の MMB で鎮静処置（0.09 ml/kg）した後，チオペンタール（ニプロ ES ファーマ，大阪）を静脈より投与（10 mg/kg）した。チオペンタールによる深麻酔が得られたことを確認し、15% KCl（丸石製薬，大阪）の投与により心停止させた。

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、肺を摘出した。摘出後，速やかに臓器の温度を下げるため、4℃に冷却してある D-PBS（富士フイルム和光純薬、大阪）を左右の気管支より洗浄瓶を用いて肺全体が膨らむ程度（各約 200 ml）注入し、on ice にて 10 分程度臓器の温度を低下させた。左肺は正常対照部位として、右肺は病変部位を中心に約 5 mm 厚で切り出しを実施した。

分子生物学的解析用には、正常対照部位として、左後葉の３領域（領域 A,B 及び C）を採取した。領域 A は臓側/壁側胸膜＋肺胞領域（胸膜と肺胞 under2mm 程度を残す）、領域 B は細気管支＋肺胞＋隔壁（領域 A から内部に 10mm 程度）、領域 C は BVB＋静脈（肺スライスの中心部に陣取る脈管＋気管支をくり抜いて）とした。病変部では、右後葉を個体ごとの病変の状況に応じて１領域から３領域を採取した。

病理組織学的解析用として、左肺は対照部位として、右肺はシングルセル解析用サンプルと対面で切り出した肺を、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて室温にて 48-72 時間浸漬固定した。

病理組織的評価を担当する山野へ得られたサンプルを提供した。

2. 石綿投与 2 年間のモニタリング

「１．石綿投与 3 か月のモニタリング」と同様の実験を 8 頭のマイクロミニピッグに対して実施した。なお，2 年間のモニタリングは 2026 年 12 月までであるため，現時点でも研究は進行中である。雄は成長に伴って上下下顎犬歯が発達することから、飼育者の怪我等を防止するために、2 年間のモニタリングでは雌を選択した。

被験物質、CT 撮像、気管支内投与法は「１．石綿投与 3 か月のモニタリング」と同様である。

3. 倫理面への配慮

本実験は、岐阜大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（AG-P-N-20240060）。動物福祉に配慮した実験となるように、本実験は日本実験動物医学専門医協会が認定する実験動物医学専門医（認定第 204 号）の指導の下で実施された。

また、実験を開始する前に、本研究の詳細を関連する学生・スタッフに説明した。説明を理解し、了承した者のみを研究に参加させた。説明会において、研究に参加しない選択をしてもなんら不利益は生じないことを確認した。

図 3 実験説明会．実験参加者の安全対策を十分に取ることや、それでも残される実験のリスクを学生やスタッフへ説明し、安全のみならず安心にも配慮した実験を計画した。

C．研究結果

「2. 石綿投与 2 年間のモニタリング」は進行中であるため、ここでは「１．石綿投与 3 か月のモニタリング」のみを記載する。

なお、石綿投与 2 年間のモニタリング実験において、被験物質投与前、投与後 3 日、4 週間、３ヶ月の CT 撮像は終了している。2 年間の観察が終了する 2026 年 12 月まで、今後も 3 か月ごとに CT 撮像を継続する予定である。

1）被検動物のモニタリング

被検物質を投与した動物の一般状態は獣医師により観察され，定期的にCT撮像ならびに血液検査によって病態が評価された。

石綿を胸腔内へ投与した個体は、投与後3日前後まで食欲不振、活動量の低下を示した。被験物質投与に伴う気胸（図4胸部CT画像参照）が原因であると判断し、体調が回復するまで動物の観察を続けた。

投与後の一時的な元気消失が過ぎると、発咳も治まった。体調を回復したのち被検動物は臨床的な異常を示さなかった。3か月の実験期間を通じて体重の減少は認められなかった。

2）CTイメージ

石綿投与3か月のモニタリング実験において、被験物質投与前、投与後3日、4週間、３ヶ月（解剖前）のCT撮像を実施した。

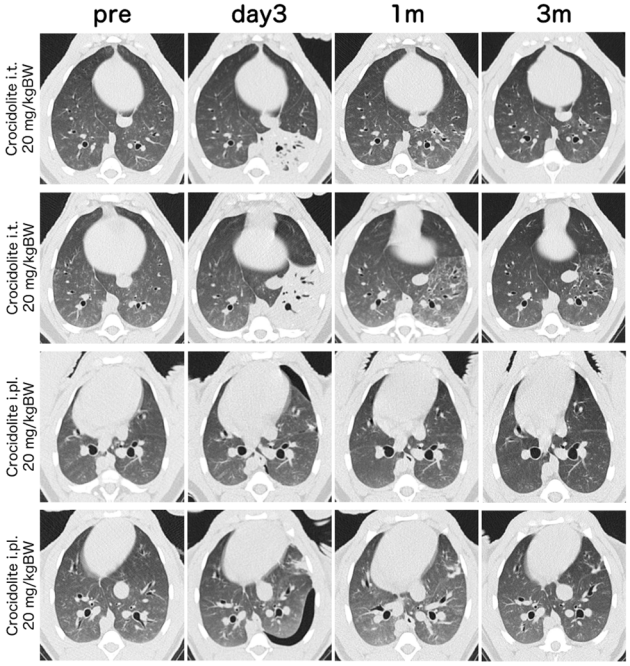

図4 ４頭のマイクロミニピッグにおける胸部CT画像．投与前、投与3日後、投与１ヶ月後、投与３ヶ月後に際して、全身麻酔条件下にて胸部CTを撮影した。上段2つは気管支内投与個体であり、下段2つは胸腔内投与個体。

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。

D．考察

令和6年には前例のない「石綿をブタ肺（胸腔）へ投与する」実験を完遂できた。当初、どのような臨床経過を辿るか分からない不安、途中死亡しないかなどの不安もあったが、3か月のモニタリングを完遂できた。

また、実験を実施するに際し、参加者へ不利益のないように説明できた。幸い説明を聞いた学生・スタッフは十分に理解し、積極的に実験へ参加してくれた。

今後、代表の山野や分担の七野、山本を含めた研究チームで結果を議論し、石綿による病理の理解を深める必要がある。

E．結論

令和6年には、前例のないブタへの石綿投与実験を実施できた。今年度、石綿投与 3か月のモニタリングならびに3ヶ月(13週間)有害性試験を実施できた。また、2年間のモニタリングをキックオフできた。

G．研究発表

1．論文発表

1) Hano, K., Takashima, S., Inatani, Y., Kainuma, R., Oiji, Y., Nakamura, K., Yayota, M. and Takasu, M.: Ovarian dynamics in progesterone tablet-induced superovulation in goats assessed by magnetic resonance imaging. Anim. Sci. J. 95: e13914, 2024.

2) Inage, Y., Fujimori, K., Takasu, M., Matsui, K., Kinoshita, Y., Morimoto, K., Koda, N., Yamamoto, S., Yamanaka, S., Matsumoto, K., Shimada, K., Kuroda, T., Ikeda, A., Inoue, M., Yokoo, T. and Kobayashi, E.: Fetal kidney grafts and organoids from microminiature pigs: Establishing a protocol of production and long-term cryopreservation. Intl. J. Mol. Sci. 25: 4793, 2024.

3) Endo, S., Morikawa, Y., Suenami, K., Sakai, Y., Abe, N., Matsunaga, T., Hara, A. and Takasu, M.: Involvement of porcine and human carbonyl reductases in the metabolism of epiandrosterone, 11-oxygenated steroids, neurosteroids, and corticosteroids. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 243: 106574, 2024.

4) Ando, A., Matsubara, T., Suzuki, S., Imaeda, N., Takasu, M., Shigenari, A., Miyamoto, A., Ohshima, S., Kametani, Y., Shiina, T., Kulski, J. K., and Kitagawa, H.: Genetic links between reproductive traits and amino acid pairwise distances of swine leukocyte antigen alleles among mating partners in Microminipigs. Intl. J. Mol. Sci. 25: 7362, 2024.

5) Matsubara, T., Fukatsu, R., Yamamoto, M., Moriya, M., Hano, K., Nakamura, K., Ohba, Y. and Takasu, M.: Assessment of horse behavior using an activity monitoring device used for cats and dogs. J. Equine Sci. 35: 47-55, 2024.

6) Yoshihara, T., Tozaki, T., Nakaya, S., Takasu, M., Kawate, K., Furukawa R., Kikuchi, M., Ishige, T.,

Nagata, S., Kakoi, H., Hobo, S.: Genetic characterization of phenotypic traits in endangered Taishu horse breed and their breeding strategy. J. Equine Vet. Med. 144: 105233, 2025.

7) Hisaeda, K., Ono, T., Shimokawa-Miyama, T., Hata, A., Iwata, E., Hiasa, Y., Ohzawa, E., Tozaki, T., Murase, H., Takasu, M., Nishii, N. and Kitagawa, H.: Differences in serum iron concentrations between the summer and winter in Noma horses. J. Equine Sci. 36: 1-9, 2025.

2．学会発表

1) 加藤大輝、宮崎正道、杷野一輝、泉満里愛、トーパイン、高須正規．マイクロミニピッグにおける非侵襲的な卵子採取法の開発．第 167 回 日本獣医学会．258，帯広
2) 杷野一輝、青山忠義、高須正規．補助生殖医療システムの開発における工学と獣医学のインタラクション．第 167 回 日本獣医学会．259，帯広
3) 杷野一輝、坂本裕太郎、髙島諭、髙須正規ドライケミストリーカートリッジを用いたマイクロブタの血中プロゲステロン濃度測定．第 167 回 日本獣医学会．265，帯広
4) 泉満里愛、田中都、越智梢、菅波孝祥、関あずさ、平田暁大、 加藤大輝、杷野一輝、森羽純、髙須正規．ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマイクロミニピッグの作出．第 167 回 日本獣医学会．334，帯広
5) Miki, N., Ota, T., Takasu, M. and Kanno, Y. Implantable Hemofiltration Microfluidic Device for Hybrid Renal Replacement Therapy. The 15th Japan-China-Korea Joint Conference on MEMS/NEMS, 2024 ChengdMiki, N., Ota, T., Takasu, M. and Kanno, Y. Implantable Hemofiltration Device for Hybrid Renal Replacement Therapy. 69th ASAIO annual conference 2024 Baltimore

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

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開発（240202-02）
分担研究項目：ブタ肺からの中皮細胞 1 細胞遺伝子発現解析に関する研究

研究分担者　七野　成之　東京理科大学 生命医科学研究所　炎症・免疫難病生業部門　講師

研究要旨

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おいて、石綿病態の中心の一つである中皮細胞の詳細な変化を 1 細胞単位で評価し、モデルとしての有用性や新規治療標的分子を同定することが、本研究の目的の一つである。分担者らのこれまでのマウス・ヒト・ブタ・ラット肺の 1 細胞 RNA-seq 解析により、中皮細胞は肺検体においてその数が非常にすくなく、また有効な表面マーカー分子もないため、濃縮する新規手法の確立が必須である。そこで本年度は、分担者が開発した組織の凍結保存方法および 1 細胞 RNA-seq 解析法を用いることで、ブタ肺検体より中皮細胞を効果的に 1 細胞 RNA-seq 解析可能な手法の開発を行った。検体採取方法として胸膜下組織の切り出しまたは胸膜のカミソリによる剥ぎ取り、検体保存方法として 3 種類の凍結保存液、また中皮細胞の濃縮方法を検討した。各凍結保存組織より単細胞懸濁液を酵素消化により得て、1 細胞 RNA-seq 解析したところ、凍結保存液による細胞集団の変化は少ない一方、胸膜剥ぎ取り検体において中皮細胞が多く濃縮されていることが見出された。また剥ぎ取り検体における中皮以外の主な細胞集団はマクロファージおよび内皮細胞であることが見出された。肺を覆う胸膜に中皮細胞が濃縮されていることが見出されたため、さらに他 2 頭のブタ肺検体を用い、摘出肺の表面に可能な限り触れずに、胸膜下切り出し検体、および剥ぎ取り検体を、血球細胞および内皮細胞とそれ以外の細胞とで 1:1 の比率に調整した上で解析した。その結果、剥ぎ取り検体だけでなく、胸膜下切り出し検体においても十分量の中皮細胞が検出され、検出の度合いの再現性は胸膜下切り出し組織のほうが高かった。同定された中皮細胞の遺伝子プロファイルより、ブタの中皮細胞はヒト・マウスと同様のマーカー遺伝子を発現していることも見出された。これらより、石綿を肺に投与したブタ検体より、効果的かつ安定して中皮細胞の性質を解析するための系(胸膜下組織を胸膜を傷つけないように切り出し、CD45/CD31 陰性集団を濃縮する)の確立に成功した。

A．研究目的

石綿関連疾患の重要な現象の一つに、肺胸膜の中皮細胞の性質変容と、悪性中皮腫の発生がある。その分子機序を解明する上で、個々の細胞の性質の違いを網羅的に解析可能な1細胞RNA-seqは効果的なツールであるが、通常の肺検体の取得方法では中皮細胞はごく微量しか含まれず、十分な解析が困難であった。本年度の分担研究では、ブタ肺より中皮細胞を効果的に濃縮して取得し、1細胞RNA-seq解析を行うための実験系の確立を行った。

B．研究方法

本研究では、肺の構造が最もヒトに類似しているブタを用い、ヒトに近しい石綿関連疾患の新たな疾患モデルの確立を目的としている。そこで、岐阜大学にて飼育している、マイクロミニピッグ 3 頭由来の正常肺検体を用い、中皮細胞の濃縮方法と 1 細胞 RNA-seq 解析方法の検討を実施した。

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。(2)の検体はごく微量であるため、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 1)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。残りの 2 頭由来の検体については、最初の 1 頭とことなり、摘出肺表面になるべく触れずに(=胸膜の傷つけを最小限として)検体を採取し、すべての検体について CELLBANKER 1 で検体を凍結保存し、得た細胞懸濁液から磁気分離により CD45 または CD31 陽性細胞と陰性細胞に分離したあと 1:1 で混合し、TAS-Seq2 法により 1 細胞 RNA-seq 解析を行った。

(1) の検体の内訳は、A0954: 肺臓側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）、A0955: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER2（無血清タイプ）、A0962: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：STEM-CELLBANKER GMP grade（無血清ハイグレードタイプ）、A0963: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER1（血清タイプ）、・A0964: 壁側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質

は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）である。

(2) の検体の内訳は、臓側または肋骨側、表層中皮剥離組織または胸膜組織、保存液はすべてCELLBANKER 1である。

得られた1細胞RNA-seqデータのクラスタリング解析を行い、中皮細胞クラスターを、他生物種で知られている特徴的なマーカー遺伝子(CST6, UPK1B, ALOX15, ENSSCG00000008001(MSLN), CLDN15, SERPINE3)の発現により同定し、その含有割合を評価し、それぞれの検体取得方法が中皮細胞取得と解析に適しているかを検討した。

（倫理面への配慮）

ブタを使用した動物実験については当該施設の「動物実験委員会」に本研究内容を申請し、承認を得たうえで 3R に十分配慮して、実験を実施しデータの取得を行ったものである。

C．研究結果

図1に示すように、ブタ胸膜下組織および胸膜剥離組織の1細胞RNA-seqデータをUMAPに示した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、クラスター5が中皮細胞であることが見出された。条件間での細胞構成比を図2に示す。これより、臓側胸膜剥ぎ取り組織が最も中皮細胞を含んでいる一方、その他の組織は含有量がすくないこと、また凍結保存液の影響は大きくないが、CELLBANKER1で保存した胸膜下組織が最も中皮細胞を含んでいることが見出された。

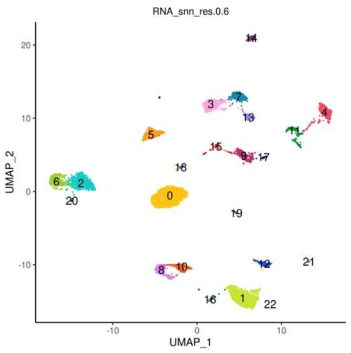

図1 胸膜剥離および胸膜下組織の1細胞RNA-seqデータのクラスタリング解析

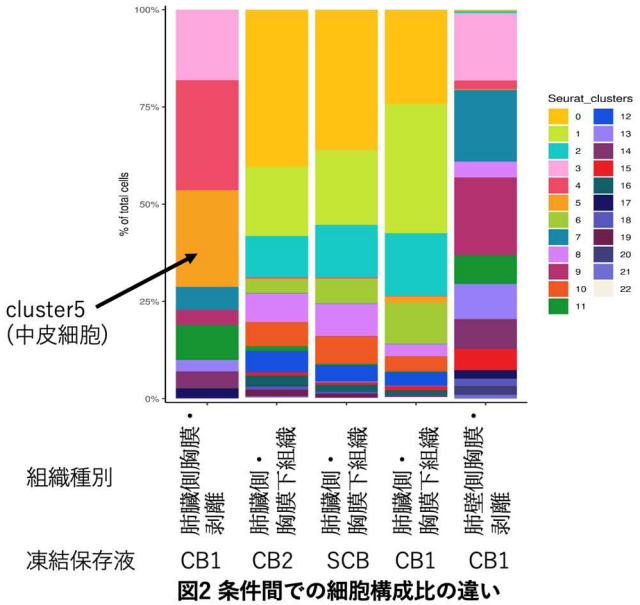

図2 条件間での細胞構成比の違い

図3に、2頭のブタ肺において同様に検体採取の手法の違いに応じた細胞構成比の違いを示す。

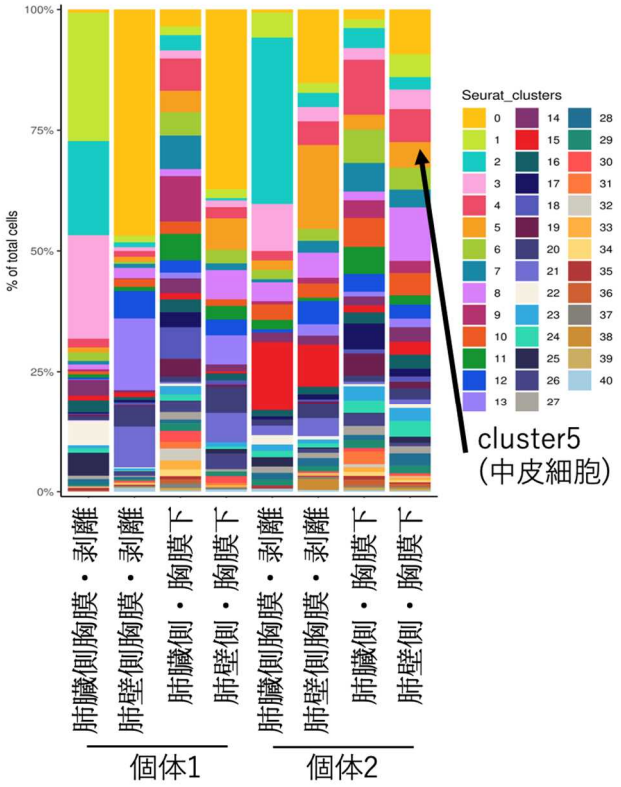

図3 別個体での細胞構成比の検証

CD45またはCD31陽性細胞の含有量を減らし。Double negative細胞と1:1で混合することで、2個体の胸膜下組織のいずれにおいても中皮細胞(cluster5)が充分量検出された。また、胸膜剥離組織は、採取部位の違いにより細胞構成が大きく異なることが見出された。異なる個体における細胞改修の再現性という観点では、胸膜下切り出し組織のほうが優れていることも見出された。

D．考察

外科的に中皮細胞が濃縮されている領域(胸膜下組織)を切り出し、また組織中に多く含まれるCD45陽性血球系細胞。CD31陽性内皮細胞の含有量を人為的に減らすことで、ブタ肺中皮細胞を十分な数1細胞RNA-seq解析により解析可能となることが見出された。本検体採取・処理手法を、石綿投与ブタ検体に適用することで、石綿関連疾患ブタモデルの詳細な1細胞RNA-seq解析(中皮細胞だけでなく、周囲の間質細胞や血球系細胞も含んだプロファイリングや、細胞間相互作用解析、細胞分化系譜解析など)が可能になることが期待される。

E．結論

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。

G．研究発表

1．論文発表

1) Kensuke Miyake, Junya Ito, Kazufusa Takahashi, Jun Nakabayashi, Frank Brombacher, Shigeyuki

Shichino, Soichiro Yoshikawa, Sachiko Miyake, Hajime Karasuyama, Nature communications 15(1) 1666-1666, 2024

2) Takatoshi Enomoto, Yuya Shirai, Yoshito Takeda, Ryuya Edahiro, Shigeyuki Shichino, Mana Nakayama, Miho Takahashi Itoh, Yoshimi Noda, Yuichi Adachi, Takahiro Kawasaki, Taro Koba, Yu Futami, Moto Yaga, Yuki Hosono, Hanako Yoshimura, Saori Amiya, Reina Hara, Makoto Yamamoto, Daisuke Nakatsubo, Yasuhiko Suga, Maiko Naito, Kentaro Masuhiro, Haruhiko Hirata, Kota Iwahori, Izumi Nagatomo, Kotaro Miyake, Shohei Koyama, Kiyoharu Fukushima, Takayuki Shiroyama, Yujiro Naito, Shinji Futami, Yayoi Natsume Kitatani, Satoshi N ojima, Masahiro Yanagawa, Yasushi Shintani, Mari Nogami Itoh, Kenji Mizuguchi, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Yoshikazu Inoue, Atsushi Kumanogoh. SFTPB in serum extracellular vesicle s as a biomarker of progressive pulmonary fibrosis. JCI Insight 2024 in press.

3) Ayaka Iwata, Juri Maruyama, Natsuki Shibata, Akira Nishiyama, Tomohiko Tamura, Minoru Tanaka, Shigeyuki Shichino, Takao Seki, Toshihiko Komai, Tomohisa Okamura, Keishi Fujio, Masato Tanaka, and Kenichi Asano, Egr2 drives the differentiation of Ly6Chi monocytes into fibrosis-promoting macrophages in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice.Communications Biology, 2024, in press

4) Yoshitaka Taketomi , Takayoshi Higashi, Kuniyuki Kano, Yoshimi Miki, Chika Mochizuki,, Shota Toyoshima, Yoshimichi Okayama, Yasumasa Nishito, Susumu Nakae, Satoshi Tanaka, Suzumi M Tokuoka, Yoshiya Oda, Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima , Noriyuki Akahoshi, Satoshi Ishii, Jerold Chun, Junken Aoki, Makoto Murakami Lipid-orchestrated paracrine circuit coordinates mast cell maturation and anaphylaxis through functional interaction with fibroblasts Immunity. 2024 Aug 13;57(8):1828-1847.e11.

2．学会発表

1) Shigeyuki Shichino. TAS－Seq2 is a sensitive cDNA amplofication system for single-cell RNA-seq. Biology of Genomes, Cold Spring Harbor Laboratory, ポスター, 2024/5/7-12.

2) Shigeyuki Shichino. Development of STomics+TAS-Seq method for highly-sensitive,unbiased spatial transcriptomics. Adovancement of STOmics and Single Cell Technologies Forum 2024, 京都大学, 招待講演, 2024/5/30.

3) Bin Wu, Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Toshihiro Ito, Kouji Matsushima. Unraveling lung epithelial cell injury and fibrosis: a robust ex vivo culture model for investigating molecular interactions and diseases pathogenesis. 第 45 回日本炎症・再生医学会, 福岡国際会議場, ポスター, 2024/7/17.

4) Munetomo Takahashi, Mikiya Tsunoda, Shigeyuki Shichino, Shumpei Ishikawa, Kouji Matsushima, Satoshi Ueha. LAG-3 blockade reactivates the CD8+ T cell expansion program to re-expand contracted clones in the tumor. 第 53 回日本免疫学会学術集会, 出島メッセ長崎, 口頭・ポスター, 2024/12/3-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

出願番号　：PCT/JP2020/027123
発明者　　：松島綱治・上羽悟史・七野成之・伊藤哲・青木寛泰
発明の名称：ビーズ担体を用いた cDNA 増幅方法
出願人　　：東京理科大学
出願日　　：2020 年 7 月 10 日
取得状況：EP/CN で 2024 年成立

２．実用新案登録

該当なし

３．その他

該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

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開発（240202-02）
分担研究項目：ブタとヒトの胸膜細胞における 1 細胞解析結果比較に関する研究

研究分担者　山本雄介　国立がん研究センター研究所 病態情報学ユニット 独立ユニット長

研究要旨

本研究は、1 細胞 RNA-seq 解析を用いることで、ブタとヒトの胸膜組織の遺伝子発現の網羅的な解析を実施するとともに、胸膜細胞（中皮細胞）に焦点を当て、ブタ由来の中皮細胞の比較解析を目的とした。ヒト胸膜組織のデータは、公共データベースである Gene Expression Omnibus（GEO）に保管されている８症例の胸膜の 1 細胞 RNA-seq データを用いた(GSE243446)。R 言語上で使用できる 1 細胞 RNA-seq データ解析プログラムである Seurat を用いて、UMAP によって次元削減を行い、細胞集団の可視化を行った。細胞種ごとのマーカー遺伝子の発現パターンをもとに細胞集団を解析し、MSLN、UPK3B などのマーカー遺伝子の発現から中皮細胞のクラスターを特定した。中皮のクラスターにおいては、これまで中皮細胞のマーカーとして知られている遺伝子群が特異的に発現していた。次に、ブタ胸膜に由来する細胞の解析を行った。採取方法の異なった５種類の胸膜組織から 1 細胞 RNA-seq を実施し、1 細胞レベルでの遺伝子発現データを取得した（実験の詳細は、分担者七野の項を参照）。ヒト胸膜細胞の解析と同様に、Seurat を用いて解析を行ない、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。ヒトとブタの 1 細胞 RNA-seq データの比較解析より、257 遺伝子が、ヒトとブタにおいて共通して発現する遺伝子群として同定された。共通に発現する遺伝子プロファイルより、ブタの胸膜組織が効率的に取得できていることが確認できた。

A．研究目的

ヒトとブタの胸膜組織は形態的に類似していると考えられているが、1細胞RNA-seq解析を用いた遺伝子発現レベルでの詳細な解析は行われていない。中皮細胞において石綿関連疾患の評価を行うにあたり、1細胞レベルでのブタ中皮細胞の解析は必須である。本研究では、ヒト胸膜組織データとブタ胸膜組織細胞のデータの比較解析を実施することで、ブタ由来の中皮細胞の特定並びに性状解析を行う。

B．研究方法

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。細胞種のマーカー遺伝子の発現パターンより、細胞の種類の特定を行った。５症例のブタ胸膜の 1 細胞 RNA-seq データは、実験的に取得した A0954: 肺臓側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）、A0955: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER2（無血清タイプ）、A0962: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：STEM-CELLBANKER GMP grade（無血清ハイグレードタイプ）、A0963: 胸膜組織（中皮+胸膜下間質ごと）：CELLBANKER1（血清タイプ）、・A0964: 壁側胸膜の表層中皮の剥離（胸膜下間質は含まない）：CELLBANKER1（血清タイプ）を統合して解析を行った。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。

（倫理面への配慮）

本研究で使用したヒト胸膜データは全て公共データベースより取得したデータであり、患者個人情報に結びつくものは無く、個人の人権、利益に支障を及ぼさない手続きがなされている。ブタを使用した動物実験については当該施設の「動物実験委員会」に本研究内容を申請し、承認を得たうえで 3R に十分配慮して、実験を実施しデータの取得を行ったものである。

C．研究結果

本年度、ブタ胸膜から採取した細胞の1細胞RNA-seqデータとヒト胸膜1細胞RNA-seqデータの比較解析を行った。図1Aに示すように、ヒト胸膜1細胞RNA-seqデータをUMAPに示した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、ヒト中皮細胞のクラスターを特定した。同様の解析をブタ胸膜から採取した細胞を用いた1細胞RNA-seq解析においても実施した（図1B）。遺伝子の発現パターンから、0～22の23種類の細胞クラスターに分類した。中皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンより、クラスター５がブタ中皮細胞であることを特定した。ヒトとブタのデータセットを用いて、それぞれの中皮細胞で選択的に発現している遺伝子群の抽出を行った。ヒト中皮細胞クラスターでは、925遺伝子が、ブタ中皮細胞クラスターでは、1907遺伝子が特徴的に発現していることが分かった。さらに、それらのうち、257遺伝子がヒトとブ

タの中皮細胞において、共通して発現していることを確認した（図1C）。それらの遺伝子の中で、特に中皮細胞において特異的に発現している遺伝子を例としてブタデータセットのUMAP上に示した（図1D）。

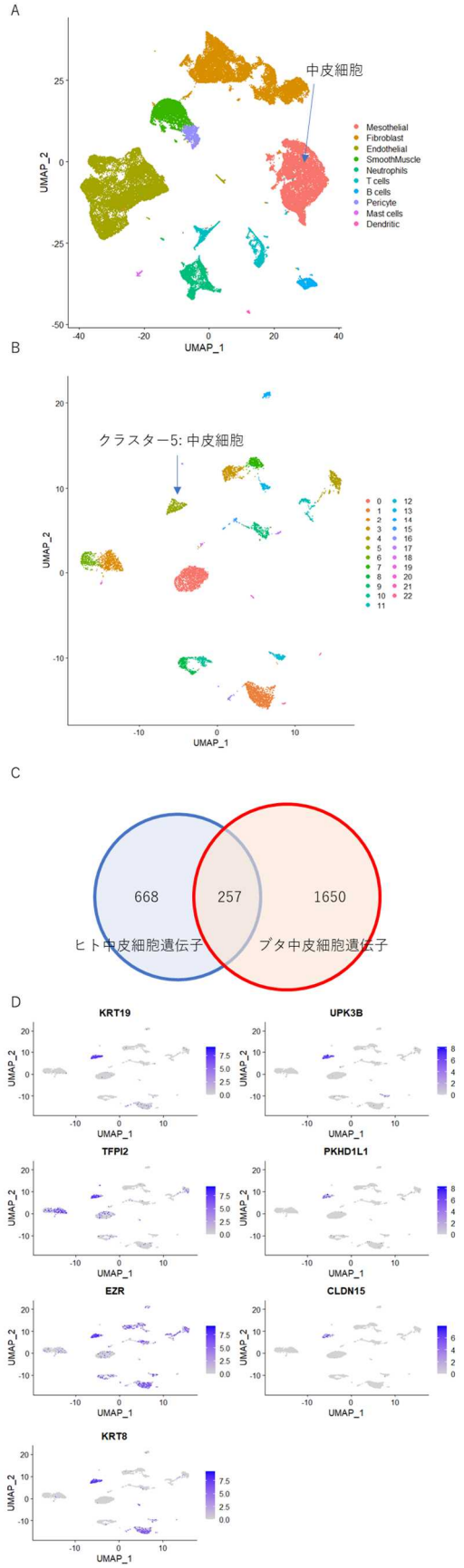

図1. ヒトとブタ中皮細胞1細胞RNA-seqの比較解析

D. 考察

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、石綿による傷害により、それらのマーカー遺伝子の発現パターンが変化することが予想される。また、石綿傷害胸膜と正常の胸膜の中皮細胞の比較解析を行うことで、石綿によって生じる細胞へのダメージの詳細な分子メカニズムの解明が期待できる。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagao Y, Yokoi A, Yoshida K, Kitagawa M, Asano-Inami E, Kato T, Ishikawa M, **Yamamoto Y**, Kajiyama H. “Uterine leiomyosarcoma cell-derived extracellular vesicles induce the formation of cancer-associated fibroblasts.” BBA - Molecular Basis of Disease, 1870(4):167103. (2024)
2) Uehara T, Matsuzaki J, Yoshida H, Ogawa Y, Miura J, Fujimiya H, **Yamamoto Y**, Kawauchi J, Takizawa S, Yonemori K, Sakamoto H, Kato K, Ishikawa M, Ochiya T. “Potential utility of pretreatment serum miRNAs for optimal treatment selection in advanced high-grade serous ovarian cancer.” Jpn J Clin Oncol, 54(8):917-925. (2024)
3) Prieto-Vila M, Yoshioka Y, Kuriyama N, Okamura A, **Yamamoto Y**, Muranaka A, Ochiya T. “Adult cardiomyocytes-derived EVs for the treatment of cardiac fibrosis.” J Extracell Vesicles, 13(7):e12461. (2024)
4) Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, **Yamamoto Y** & Ochiya. “Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression.” Cell Reports, 43(8):114517. (2024)
5) Shibata M, Yoshida K, Yokoi A, Suzuki H, **Yamamoto Y**, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yasui Y, Nishiko Y, Yoshihara M, Tamauchi S, Yoshikawa N, Nishino K, Yamamoto E. “Elucidation of the role of XBP1 in the progression of complete hydatidiform mole to invasive mole through RNA-seq.” Gynecologic Oncology, 190:189-199. (2024)
6) Suzuki K, Yokoi A, Matsuzaki J, Yoshida K, **Yamamoto Y**, Kato T, Ishikawa M, Ochiya T, Kajiyama H. “Circulating serum miRNAs

predict response to platinum chemotherapy in high-grade serous ovarian cancer." Cancer medicine, 13(22):e70251. (2024)

7) Nakamichi K, Suzuki H, **Yamamoto Y**, Semba K, Nakayama J. "Nuclear receptor profiling for subtype classification and as prognostic markers in 33 cancer types." Discover Oncology, 24;15(1):834. (2024)
8) Yoshihara K, Ito K, Kimura T, **Yamamoto Y**, Urabe F. "Single-cell RNA sequencing and spatial transcriptome analysis in bladder cancer: Current status and future perspectives." Bladder cancer (Amsterdam, Netherlands), 21;11(1):23523735251322017. (2025)
9) Yamamoto T, Urabe F, Yoshioka Y, **Yamamoto Y**, Ochiya T. "Protocol for extracellular vesicle secretion-related gene screening via ExoScreen technique." STAR protocols, 21;6(1):103569. (2025)
10) Yoshida K, Yokoi A, Suzuki H, Tamauchi S, Kitagawa M, Inami E, Nakayama J, Mori Y, Okamoto K, Suzuki Y, Yoshida H, Kato T,Kajiyama H, **Yamamoto Y**. "Single-Nucleus RNA Sequencing and Spatial Transcriptomics for Squamous Cell Carcinoma Arising From Ovarian Mature Teratoma." Cancer science, Online ahead of print. (2025)
11) Harada K, Sakamoto N, Kitaoka T, Nakamura Y, Kondo R, Morisue R, Hashimoto H, **Yamamoto Y**, Ukai S, Maruyama R, Sakashita S, Kojima M, Tanabe K, Ohdan H, Shitara K, Kinoshita T, Ishii G, Yasui W, Ochiai Y, Ishikawa S. "PI3 expression predicts recurrence after chemotherapy with DNA-damaging drugs in gastric cancer." The Journal of pathology,265(4) 472-485. (2025)
12) Xian W, Wang S, Xie J, **Yamamoto Y**, Khorrami M, Zhang Y, Montes RC, Desales C, Khorrami M, Mory Z, Hoffman A, Su A, Nguyen C, Davies PJA, Stephan C, Pan S, Wu W, Liu Y, Siegelman J, Waters RE, Ross WA, Song S, Metersky M, Beer DG, Crum CP, Stewart AJ, Vincent M, Russell R, Izard RA, Ho KY, Hung-Sen Lai J, Bachovchin WW, Ajani JA, McKeon FD. "Evolution of Esophageal Adenocarcinoma from Precursor Lesion Stem Cells."Gastroenterology, 14:S0016-5085(25)00521-9. (2025)

2. 学会発表

1) 平野 悠太, 鈴木 公基, 中山 淳, 山元 智史, 荒屋 潤, 藤田 雄, **山本 雄介**. シングルセルメタ解析によって明らかとなった肺腺癌と肺扁平上皮癌における繊維芽細胞の特性. 日本癌学会総会. 83回 E-1018 2024年9月
2) 中山 淳, 都倉 桃子, **山本 雄介**. 浸潤性小葉がんにおける空間遺伝子発現と細胞特性の解明. 日本癌学会総会 83回 P-1105 2024年9月
3) 田村 貴明, 山元 智史, 木暮 暁子, 吉岡 祐亮, **山本 雄介**, 坂本 信一, 市川 智彦, 落谷 孝広. 転移性前立腺癌に教育された破骨細胞由来細胞外小胞は骨転移巣で腫瘍進展・骨破壊を促進する. 日本癌学会総会 83回 P-2163 2024年9月
4) 鈴木 一弘, 横井 暁, 吉田 康将, 北川 雅美, 長尾 有佳里, 北井 美穂, 須藤 保, **山本 雄介**, 梶山 広明, 横井 暁. 卵巣癌プラチナ抵抗性の克服に向けた細胞外小胞関連JAK/STAT経路解析. 日本癌学会総会 83回 J-3003 2024年9月
5) 吉原 健太郎, 占部 文彦, 鈴木 公基, 木村 高弘, **山本 雄介**. 膀胱癌 En Bloc 切除標本の空間トランスクリプトーム解析による浸潤機構の解明. 日本癌学会総会 83回 P-3250 2024年9月
6) 植草 良輔, 横井 暁, 北川 雅美, 吉田 康将, 松崎 潤太郎, **山本 雄介**, 梶山 広明, 北川 雅美. がんリキッドバイオプシーの現状と新展開 高異型度漿液性卵巣癌における細胞外小胞関連DNAを用いた新たな臨床有用性の検討. 日本癌学会総会 83回 S20-6 2024年9月
7) 中道 和也, 鈴木 公基, 中山 淳, **山本 雄介**, 仙波 憲太郎. 核内受容体発現プロファイルによる診断マーカーおよび治療標的の探索. 日本癌学会総会 83回 J-3065 2024年9月
8) 鈴木 公基, 吉田 康将, 平野 悠太, 横井 暁, 梶山 広明, **山本 雄介**. 高悪性度漿液性卵巣癌におけるPARP阻害薬耐性メカニズム解明のための空間トランスクリプトミクスと全エクソームシーケンス. 日本癌学会総会 83回 E-3059 2024年9月
9) 大嶋 一輝, 松崎 潤太郎, 中山 淳, **山本 雄介**, 津川 仁, 加藤 健, 落谷 孝広, 齋藤 義正, 松崎 潤太郎. 血中に存在する細菌由来RNAの肝臓がん発がんに対する影響の解明. 日本癌学会総会 83回 E-3053 2024年9月
10) 山元 智史, **山本 雄介**, 石井 明子, 落谷 孝広. PSAT1を介したEV分泌が促進するがん転移機構と転移リスク診断としての有用性の検討. 日本分子腫瘍マーカー研究会 44回 2024年9月
11) 大嶋 一輝, 松崎 潤太郎, 中山 淳, 津川 仁, **山本 雄介**, 加藤 健, 落谷 孝広, 齋藤 義正. 肝臓がん患者における血中循環"細菌由来RNA"プロファイルの特徴. 日本分子腫瘍マーカー研究会 44回 2024年9月
12) 都倉 桃子, 椎野 翔, 高山 伸, 首藤 昭彦, 吉田 正行, 谷田部 恭, **山本 雄介**. 遺伝子発現解析に基づいた乳がんの腫瘍内細胞不均一性に関する研究. 日本乳癌学会総会 32回 2024年7月
13) 占部文彦, 占部文彦, 古田昭, 伊藤景紀, 伊藤景紀, 吉原健太郎, 五十嵐太郎, 中山淳, **山本雄介**, 木村高弘. シングルセル発現解析によるハンナ型間質性膀胱炎の病態解明. 泌尿器科分子・細胞研究会 33回 2024年

14) 東和志, 黒岩由佳, 中道和也, 中山淳, 山本雄介, 仙波憲太郎. 新規浸潤性小葉がんモデル UACC-893 を用いた転移機構の解析. 日本がん転移学会学術集会 33 回 2024 年
15) 中道和也, 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介. 髄外病変を標的とした多発性骨髄腫の 1 細胞メタ解析. 日本がん転移学会学術集会 33 回 2024 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

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