

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7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に着手している。本研究は、石綿（アスベスト）曝露に伴う健康障害の機序解明と新たな治療法開発に貢献するため、ヒト肺と解剖学的・分子生物学的に高度な相同性を有する実験動物（マイクロミニピッグ）を用いた次世代型疾患モデルの開発、および最新のシングルセル解析技術を駆使した分子病態の特定を目的とした。

本年度は、マイクロミニピッグの正常肺アトラスを構築し、ブタ肺においてヒトの肺に存在する呼吸細気管支系譜や外膜細胞系譜など、多種多様な細胞種を遺伝子シグネチャーレベルで類似した状態にて保持していることを概説した。これは、従来の齧歯類モデルにおいて課題となっていたヒト肺構造への外挿性を補完する、極めて重要な基盤情報でブタの優位性を示すものであると考えている。また本疾患モデルとしての客観性を担保するため、投与物質（クロシドライト等）の精密な形態計測を実施し、ヒトの労災補償基準等の行政的使用データを創出する機関による線維計測データを得た。

動物実験では、前年度に開始した8頭のマイクロミニピッグに対する2年間の長期モニタリング試験を継続した。投与後1年を経過した現時点において、専門医の指導下で厳密な健康管理を行うことにより、全個体において良好な健康状態が維持されており、長期曝露試験としての完遂に向けた確実な見通しを得た。

分子病態解析においては、昨年度解剖した単回投与後3ヶ月後の肺または胸膜材料を用いて、独自に確立した標的細胞濃縮手法と高感度シングルセル解析（TAS-Seq2法）を組み合わせ、石綿曝露に伴う細胞形質の変化を網羅的に捉えた。その結果、中皮細胞における発がん関連経路の活性化や、線維化の進展に関与するCTHRC1陽性の病的線維芽細胞（Pathogenic Fibroblast）を1細胞解像度で同定した。さらに、空間トランスクリプトーム解析（Stereo-seq）により、活性化中皮細胞と外膜線維芽細胞が隣接して特定の「ニッチ」を形成している可能性を空間レベルで明らかにした。

以上の成果は、ヒト病態を精緻に再現し得る大動物疾患モデルの妥当性を遺伝子発現シグネチャーに裏付けられた1細胞解像度で裏付けられるものであり、令和8年度に予定している長期観察後に伴う最終的な石綿関連疾患の発症、その分子病態の解明と疾患モデルとしての評価に先立ち、石綿関連疾患の新規治療法開発に資する極めて重要な研究基盤を確立したといえる。

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（アスベスト）使用建築物の解体棟数は、2030年頃のピークに向けて増加しており、石綿曝露に伴う健康障害の防止は労働衛生上の喫緊の課題である。肺がん、悪性中皮腫、石綿肺などの石綿関連疾患による労災認定数は、近年年間1,000件を超えて高止まりしており、依然として多くの疾患において効果的な治療法の開発が強く求められている。

これらの疾患の分子機序解明や治療法開発には、適切な動物モデルによる研究が不可欠である。これまでマウスやラット等の齧歯類は、標準的な疾患モデル動物として多用され、医学の発展に多くの有益な知見を提供してきた。一方で、ヒトの石綿関連疾患の主座は、大血管や胸膜周囲の「広義間質」や「呼吸細気管支（RB）」にあるが、齧歯類の肺はこれらの構造がヒトに比べて未発達であるという解剖学的な相

違が知られている。この構造の相違により、肺泡領域での炎症反応が、本質的な間質病態を評価する上での課題となる可能性が指摘されており、ヒト病態をより精緻に再現し得る新たなモデル動物の確立が期待されていた。

このような背景から、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、治療法開発等に資する石綿関連疾患の疾患モデルを開発する事である。

本年度は、前年度に開始した8頭のマイクロミニピッグに対する2年間の長期モニタリング試験を継続し、臨床的な安全性と維持管理の妥当性を評価するとともに、最新の高精度1細胞解析技術（TAS-Seq2等）や空間トランスクリプトーム解析を駆使して、石綿曝露に伴う中皮細胞の形質変容や、間質細胞の分子

的応答を網羅的に捉えることを目指している。加えて投与線維の計測を実施すると共に、ブタを用いることの優位性を概説した。

B. 研究方法

1. 使用動物および倫理面への配慮

実験動物には、広義間質が発達しヒトへの外挿性が高いマイクロミニピッグ（MicroMiniPig, 富士マイクラ株式会社）を用いた。

長期モニタリング試験：雌の個体8頭を用い、2027年1月までの2年間にわたる長期観察を実施している。雌を採用したのは、雄で発達する犬歯による飼育者への危害を防止するためである。

正常肺アトラス構築：健康個体（n=3）を用い、末梢領域（胸膜含有/非含有）および中枢気道・大血管領域の3部位から厳密なサンプリングを行った。

倫理遵守：本実験は岐阜大学動物実験委員会の承認（AG-P-N-20240060）を得て、日本実験動物医学専門医の指導の下、3R（代替・削減・苦痛軽減）に十分配慮して実施された。

2. 石綿線維の精密計測と曝露条件の定義

疾患モデルの再現性を担保するため、投与する石綿線維（クロシドライトおよびアモサイト）の物理化学的特性を定量化した。

計測プロトコル：神山宣彦フェロー（労働安全衛生総合研究所）の指導の下、「神山法」に基づく透過型電子顕微鏡（TEM）およびエネルギー分散型X線分析（EDS）を用いた精密な形態計測を実施した。

曝露強度の定義：幾何平均長・径を算出するとともに、幾何標準偏差を求め、ヒトの労災補償基準を大幅に上回る曝露強度を科学的に定義して試験に供した。

3. 石綿投与および臨床モニタリング

投与手法：クロシドライト（3ヶ月試験：20 mg/kg BW、2年間試験：5 mg/kg BW）をPBSに懸濁し、気管支内（肺内）または胸腔内へ単回投与した。

臨床評価：毎日の一般状態観察、毎月の体重測定に加え、3ヶ月ごとに全身麻酔下での胸部CT撮像および血液・血液化学検査を実施し、臨床的な影響を継続的に評価している。

4. 先進医学解析技術を用いた分子・空間解析

細胞懸濁液の調製と標的細胞の濃縮：摘出した組織を機械的・酵素的に解離した。石綿病態の鍵となる中皮細胞を解析するため、Cell sorter等によりCD45/CD31陰性画分を分離・濃縮する手法を確立した。

TAS-Seq2法による1細胞RNA-seq解析：濃縮した細胞集団を1:1の比率で混合し、高感度シングル

セル解析技術（TAS-Seq2）を用いて、網羅的な遺伝子発現データを取得した。

空間トランスクリプトーム解析（Stereo-seq）：石綿病変部から組織片を採取し、細胞の空間的配置を保持したまま遺伝子発現を可視化することで、細胞間相互作用（ニッチ形成）を解析した。

5. 生体情報統計解析（バイオインフォマティクス）

データ処理：Mappingを行い、R言語上の解析プログラムSeuratを用いて死細胞除去等のクオリティチェック、次元削減（UMAP）、クラスター分類を実施した。

アノテーションと経路解析：各種マーカー遺伝子の発現パターンに基づき細胞種を同定（アノテーション）し、IPA（Ingenuity Pathway Analysis）等を用いて、石綿曝露による遺伝子発現経路の変化や活性化状態を詳細に解析した。

C. 研究結果

1. 正常ブタ肺全細胞景観および系統特定（図1～13）

正常マイクロミニピッグの肺組織から得られたRawデータに対し、Seurat（v4.4.0, R v4.3.2）を用いて解析した。低品質な細胞を除去後、合計25,305細胞を統合した。さらに、間葉系細胞の核心部を抽出するため、COL1A1陽性細胞（7,643細胞）及びEPCAM/CDH1陽性細胞（4,568細胞）に対してサブクラスタリングを実施し、13の独立した間葉系サブセット及び12の独立した上皮系サブセット等を同定した。

2. 石綿線維の精密計測（図14～15、表1）

特注の長線維石綿試料（クロシドライトおよびアモサイト）を対象に、神山法プロトコルを適用し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた形態計測を実施した。計測の結果、クロシドライトにおいて1 mgあたり約14億1400万本（幾何平均長：1.34 μm 、幾何平均径：0.11 μm ）、アモサイトにおいて1 mgあたり約1億3600万本（幾何平均長：2.05 μm 、幾何平均径：0.24 μm ）であることを算出した。また、エネルギー分散型X線分析（EDS）により、クロシドライト特有の組成（Na-Fe系角閃石）およびアモサイトに特徴的な化学組成を確認し、検体の真正性が確認された。

3. マイクロミニピッグを用いた石綿投与実験の経過

昨年度開始した、雌のマイクロミニピッグ8頭に対する石綿投与2年間のモニタリング実験は、現在も継続中である。毎日の個体観察、毎月の体重測定、3か月ごとのCT撮像および血液・血液化学検査を継続している。現時点において、被験物質投与に関連すると考えられる臨床的な異常、ならびに体重の減少等は認められておらず、全個体において良好な健康状態が維持されている。

4. 標的細胞の濃縮と空間遺伝子発現解析（図16～20）

Crosidolite（青石綿）を肺内2頭ならびに胸腔内2頭に投与した計4頭の豚から1細胞RNA-seqデータを取得し、総細胞数約18万細胞の解析を実施した。その結果、胸腔内投与群より取得した胸膜下組織由来検体において、中皮細胞を十分量（7070細胞）

検出することに成功した。さらに、空間遺伝子発現解析 (Stereo-seq) を実施した結果、DCN/ACTA2 陽性の活性化した外膜線維芽細胞 (Adventitial fibroblast)、および ALOX15 陽性の中皮細胞が隣接して存在している可能性が示唆された。

5. 細胞集団の解析および病的細胞の同定 (図21~26)

青石綿を投与したブタ肺組織の解析により、29 種類の細胞種を同定した。細胞種ごとの割合を比較検討した結果、周皮細胞の割合が、肺内と胸腔内の両方において上昇していることを見出した。中皮細胞の遺伝子発現解析では、がんに関連する経路が統計的に有意に検出され、青石綿投与によって発がんの初期過程が生じている可能性が示唆された。さらに、石綿曝露による線維化の分子の実態を解明するため、PI16 陽性細胞系譜の高解像度な再クラスター解析を実施した結果、膠原線維に加え POSTN や CTHRC1 を高発現する Pathogenic Fibroblast (病的線維芽細胞) を同定した。

D. 考察

1. 職業性肺疾患研究におけるブタ肺の解剖学的・分子的有意性

本研究における先進的ゲノム解析を駆使した高精度ブタ肺細胞アトラスの構築は、既存の齧歯類 (マウス・ラット) モデルが抱えていたヒト疾患への外挿性という課題を解決し、職業性肺疾患の病態解明に新たなパラダイムをもたらす可能性が示唆された。石綿肺はじん肺の一種であり、単なる肺泡領域の病変ではなく、広義間質に粒子が沈着・停滞することを起点とするが、齧歯類ではこの構造の発達が未熟であることが知られている。今回の解析により、ブタ肺はヒト特有の呼吸細気管支系譜やヒト型の間葉系ニッチを分子レベルで保持していることが特定され、石綿等の吸入粉塵に対するヒト組織の実際の応答を解明するための、極めて優れたリファレンスとなり得ることが示唆された。

2. 石綿線維の計測結果と曝露強度の妥当性

神山法プロトコルを用いた精密な形態計測により、投与試料の物理化学的特性を定量化した。今回の計測の結果、クロシドライトに含まれる $5 \mu\text{m}$ 以上の長線維は全体の 8.0 % であった。ブタ 1 頭あたりの総投与量 50 mg に含まれる長線維の本数を算出すると約 56.6 億本となり、これはヒトの労災補償基準の約 14 倍に相当する。この設定は、限られた観察期間内で不完全貪食 (Frustrated phagocytosis) とそれに続く慢性炎症を安定して誘発するための疾患モデルとして、病態形成を誘発するのに十分な曝露強度であり、先行研究や行政的基準と比較しても、モデルとしての妥当性が極めて高い数値であると結論づけられる。

3. 長期モニタリング試験の維持管理と完遂の見通し

石綿投与後 1 年を経過した現時点においても、全個体が臨床的に極めて健全な状態を維持している。専門医の指導下で厳密な健康管理を行うことにより、呼吸器系への局所的な病変形成を許容しつつ、個体としての生存性と活力を高い水準で両立できている。このことは、令和 8 年度に予定している最終解剖において、偶発的な死亡例によるデータ欠損のリスクが極めて低いことを示唆しており、長期曝露試験として高い精度での完遂が確実視される。これにより、これまでに実施されたことのない長期にわたる大型実験動物を用いた石綿研究を完遂できると考えられる。

4. 1 細胞解像度での細胞間相互作用とヒト病態との類似性

ブタの胸膜細胞を 1 細胞レベルで解析可能な系を確立したことで、活性化中皮細胞と外膜線維芽細胞 (adventitial fibroblast) が近接し、特定のニッチを形成している可能性が空間遺伝子発現解析により示唆された。活性化した adventitial fibroblast は、マウス線維化モデルでは認められず、ヒト線維化肺においてのみ認められることから、今回作成したブタ石綿モデルは、ヒト病態と細胞活性化パターンの観点から極めて近い可能性が見出された。今後さらに病態ステージの進んだ検体を解析することで、新たな治療標的細胞や分子が見出されることが期待される。

5. 病的細胞の同定と今後の展望

青石綿を投与したブタ肺組織の 1 細胞 RNA-seq 解析により、29 種類の細胞種を同定し、周皮細胞の割合上昇や中皮細胞における発がん関連経路の活性化を捉えることに成功した。さらに、石綿肺やびまん性胸膜肥厚が炎症性線維性疾患であることから、PI16 陽性細胞系譜に注目して再解析を実施した結果、ヒトの線維化疾患においても重要視される CTHRC1 陽性の Pathogenic Fibroblast (病的線維芽細胞) を同定した。これらの成果は、石綿曝露による線維化の分子の実態を解明する上で極めて重要な知見であり、今後、2 年間飼育ブタについてさらなる詳細な解析を進める。

E. 結論

マイクロミニピッグは、齧歯類モデルにおいて不可避であった解剖学的構造 (呼吸細気管支や広義間質)、細胞種の多様性、および機能遺伝子の保存性、の全階層にわたる種差を克服し、ヒト肺組織の生理的応答をシングルセル解像度で忠実に再現し得る高度な解析基盤であることを実証した。本知見は、次世代の疾患モデル構築およびリスク評価にお

いて、従来の齧歯類モデルでは到達し得ない高度な優位性を有することが示唆された。

神山法プロトコルおよび岡山労災病院の計測技術を統合し、被験物質の物理化学的特性に関する精密な定量評価を完了した。本知見は、マイクロミニピッグ疾患モデルにおける線維曝露量と病態進展の相関を解明する上での標準データ（リファレンス）となり、次世代の先進的医学解析と統合した詳細な病態検討に供されるものである。

2年間にわたる観察は順調に遂行できている。2027年1月の解剖まで、現状を維持していくことで、これまでに実施されたことのない長期にわたる大型実験動物を用いた石綿研究を完結できると考えられる。

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。これにより、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。

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。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ことを踏まえ、令和8年度に取得予定の青石綿投与肺組織への長期的な影響について、詳細な解析を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi S, Kobayashi Y, Takashima S, Ide W, Murahata Y, Yayota M, Takasu M, Sassa-O'Brien Y, Shibata S. Comparison of serum paraoxonase 1, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase activities among dogs, cats, micro-mini pigs, and goats. *J Vet Med Sci*. 2026 May 1. doi: 10.1292/jvms.26-0156.
- 2) Miyake T, Kawano Y, Kashihara T, Takasu M, Takagaki K, Fujimoto S, Kawaguchi T, Kagemoto K, Kida Y, Okamoto K, Sogabe M, Muguruma N, Tsuneyama K, Sato Y, Takayama T. Orthotopic Esophageal Cancer Xenograft Model in Immunosuppressed Microminipigs for Near-Infrared Fluorescence Endoscopy. *Cancer Sci*. 2026 Apr 3. doi: 10.1111/cas.70378.
- 3) Ohki T, Miyawaki S, Higa T, Yamazaki H, Okaki H, Nakajima R, Kitamura K, Nakagawa MG, Sanosaka T, Tsugawa H, Honda K, Hirata A, Goto T, Handa M, Tokutake K, Saeki S, Yamamoto M, Watanabe K, Maeda S, Takasu M, Sugiura Y, Takiuchi T, Kohyama J, Suematsu M, Hirata H. Identification of endometrial CD169+ macrophages essential for Treg cell accumulation and implantation. *Cell Rep*. 2026 Mar 24;45(3):117040.
- 4) Umemura A, Takasu M. Sense–Science–Significance Model: A Museum Education Framework for Engaging Visitors with Cultural

Heritage. *Journal of Museum Education*. 2026: 1–13.

- 5) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles. *Nanomaterials*. 2026 Feb;16(4):230.
- 6) Tamauchi S, Yoshida K, Xinyuan W, Nakagawa A, Yokoi A, Yoshikawa N, Niimi K, Yamamoto Y, Kajiya H. In-tumor CRISPR-Cas9 knockout screening and novel therapy development for malignant transformation of ovarian teratoma. *Cancer Science*. 117(4):983–995, 2026.
- 7) Hirano Y, Suzuki H, Nakayama J, Yamamoto T, Hirata E, Araya J, Fujita Y, Yamamoto Y. An Integrated Single-Cell Lung Cancer Atlas Reveals Distinct Fibroblast Phenotypes between Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinomas. *npj Precision Oncology*. 10(1):72, 2026.
- 8) Hirano Y, Yoshida M, Watanabe N, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y. Reply to: Towards causal validation and clinical translation of the PAK2–fibroblast axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 67(3):2502353, 2026.
- 9) Tsubaki S, Nashimoto S, Tanaka R, Toyomoto T, Tsutsuki H, Kato K, Nakayama J, Kimura K, Oshima K, Yamamoto Y, Okusaka T, Esaki M, Kawai N, Ota N, Yoshioka Y, Ochiya T, Saito Y, Sawa T, Hozumi K, Matsuzaki J, Tsugawa H. Gut commensal *Klebsiella pneumoniae* extracellular vesicles shape a liver microenvironment. *Journal of Extracellular Vesicles*. 15(4):e70262, 2026.
- 10) Yoshihara K, Urabe F, Umemori M, Suzuki H, Ito K, Yanagisawa T, Sato S, Sekine K, Kimura T, Yamamoto Y. Spatial transcriptomics of en bloc transurethral resection of bladder tumor specimens. *npj Precision Oncology*. in press, 2026.
- 11) Thaw P, Hano K, Saito I, Kanda T, Kitagawa H, Takasu M. Establishment of a step-down FSH superovulation protocol in microminipigs. *In Vivo*. 40: 89–98, 2026.
- 12) Yoshihara T, Tozaki T, Kawate K, Furukawa R, Kikuchi M, Ishige T, Kakoi H, Takasu M, Hobo S. SNP array-based genomic inbreeding and relatedness analyses in Taishu horse. *Livestock Sci*. 304: 105898, 2026.
- 13) Xu P, Ueha S, Aoki H, Kitabatake M, Chen M, Shichino S, Hara A, Ougi-Sageshima N, Ito T, Motozono C, Matsushima K. Repeated mRNA vaccination and breakthrough infection reveal durable dominance but diminishing recall of vaccine-induced CD8⁺ T-cell clones. *International Immunology*. dxag004, 2026.
- 14) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust

- transported with *Coniothyrium fuckelii*. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507.
- 15) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33.
 - 16) Takahashi M, Tsunoda M, Aoki H, Kurosu M, Ogiwara H, Shichino S, Bending D, Ishikawa S, Thaventhiran JED, Matsushima K, Ueha S. A pan-immunotherapy signature to predict intratumoral CD8⁺ T cell expansions. *Nat Commun*. 16(1):9175, 2025.
 - 17) Shirai Y, Enomoto T, Takeda Y, Edahiro R, Takahashi-Itoh M, Noda Y, Adachi Y, Nakayama M, Kawasaki T, Koba T, Futami Y, Yoshimura H, Amiya S, Hara R, Yamamoto M, Nakatsubo D, Suga Y, Naito M, Masuhiro K, Matsuki T, Hirata H, Iwahori K, Nagatomo I, Miyake K, Koyama S, Fukushima K, Shiroyama T, Naito Y, Futami S, Natsume-Kitatani Y, Ose N, Funaki S, Nojima S, Shichino S, Yanagawa M, Shintani Y, Nogami-Itoh M, Adachi J, Inoue Y, Tomonaga T, Okada Y, Mizuguchi K, Kumanogoh A. Serum vesicle biomarkers reflect the disease activity of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Trans Med*. 23(1):1102, 2025.
 - 18) Matsumoto N, Ueha S, Ueha R, Koyama M, Yamakawa K, Sato T, Goto T, Kono T, Shichino S, Matsushima K, Kondo K. HPV6-Induced Gene Expression Signature in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Laryngoscope*. 135(10):3732-3739, 2025.
 - 19) Zong C, Sato H, Schneider B, Shichino S, Ueha S, Wu B, Matsushima K, Okayama T, Ikeo K, Urushitani M, Ito H, Iwama S, Fergany A, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Acrylamide-induced noradrenergic axon degeneration is promoted via a non-cell autonomous mechanism. *J Hazard Mater*. 496:139125, 2025.
 - 20) Niitsu T, Kataoka T, Fukushima K, Motooka D, Shichino S, Natsume-Kitatani Y, Kitamura H, Niwa T, Baba T, Okuzaki D, Kumanogoh A, Akira S, Okudela K, Ogura T. Spatial transcriptomics identifies SPARC as a prognostic marker in interstitial lung diseases. *J Pathol*. 267(1):79-91, 2025.
 - 21) Matsui H, Nagamachi A, Koizumi M, Kudo R, Ajiro M, Harada H, Harada Y, Shichino S, Yoshimi A. Genotype-integrated single-cell transcriptome analysis reveals the role of DDX41 pR525H. *Sci Rep*. 15(1):22849, 2025.
 - 22) 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 ILD. *Respir Res*. 26(1):157, 2025.
 - 23) Kohda H, Tanaka M, Shichino S, Arakawa S, Komori T, Ito A, Wada E, Ochi K, Yuan X, Takeda T, Saiki A, Tatsuno I, Ikeda K, Miyai Y, Enomoto A, Morikawa Y, Shimizu S, Ueha S, Matsushima K, Ogawa Y, Suganami T. Novel cell-to-cell communications between macrophages and fibroblasts regulate obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Diabetes*. 74(7):1135-1152, 2025.
 - 24) Qiu Y, Tang XX, Shichino S, Kushwaha PP, Sanders YY, Russo RC, Mo C. Editorial: Cellular and molecular mechanisms of lung regeneration, repair, and fibrosis. *Front Cell Dev Biol*. 13:1653034, 2025.
 - 25) Tamura T, Yamamoto T, Kogure A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Sakamoto S, Ichikawa T, Ochiya T. Extracellular Vesicles From Prostate Cancer-Corrupted Osteoclasts. *Journal of Extracellular Vesicles*. 14(6):e70091, 2025.
 - 26) Kuroiwa Y, Doi Y, Nakamichi K, Yamamoto Y, Semba K. Gene signatures associated with brain-topical proliferative activity in breast cancer. *BBRC*. 775:152127, 2025.
 - 27) Watanabe N, Yoshida M, Hirano Y, Fujimoto S, Matsubayashi S, Ishiguro T, Takahashi N, Shimizu Y, Takayanagi N, Kawabata Y, Mori Y, Okamoto K, Minagawa S, Kuwano K, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y. Integrated Spatial and Single-Cell Transcriptomics Reveal PAK kinase as a Therapeutic Target. *European Respiratory Journal*. 66(4):2500022, 2025.
 - 28) Ohno H, Nishimura T, Kainoh K, Ohashi Y, Onodera N, Kano M, Sari LN, Masuda M, Tamura Y, Nishino T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Takahashi S, Mishima Y, Yoneyama Y, Takeuchi Y, Sekiya M, Matsuzaka T, Miyamoto T, Shimano H. Label-free imaging of intracellular structures in living mammalian cells. *FEBS J*. 293(4):1127-1149, 2025.
 - 29) Asano-Inami E, Yokoi A, Yoshida K, Taki K, Kitagawa M, Suzuki K, Uekusa R, Nagao Y, Yoshikawa N, Niimi K, Yamamoto Y, Kajiyama H. Proteomic profiling of bacterial extracellular vesicles for exploring ovarian cancer biomarkers. *Journal of Extracellular Biology*. 4(10):e70073, 2025.
 - 30) Suzuki K, Yokoi A, Yoshida K, Suzuki H, Kitagawa M, Asano-Inami E, Matsuo S, Yoshihara M, Tamauchi S, Yoshikawa N, Niimi K, Sudo T, Yamaguchi S, Yamamoto Y, Kajiyama H. Overcoming platinum-resistant ovarian cancer targeting the activated JAK-STAT pathways. *Communications Biology*. 8(1):1305, 2025.
 - 31) Suzuki H, Yoshida K, Yokoi A, Suzuki K, Hirano

- Y, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yoshihara M, Nagao Y, Tamauchi S, Yoshikawa N, Kajiyama H, Yamamoto Y. Exploring drug resistance via intercellular crosstalk using spatial transcriptomics. *npj Precision Oncology*. 9(1):345, 2025.
- 32) Suzuki K, Yamamoto Y, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yoshida K, Kajiyama H, Yokoi A. Differential Proteomics of Large Extracellular Vesicles in Ovarian Cancer. *Proteomics*. e70054, 2025.
- 33) Yoshida M, Watanabe N, Hirano Y, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y. Reply to: From fibroblast foci to dense scars. *European Respiratory Journal*. 66(5):2501735, 2025.
- 34) Shibata M, Yoshida K, Yasui Y, Nishiko Y, Hattori S, Nakamura K, Koya Y, Yamamoto Y, Suzuki K, Yoshihara M, Nagao Y, Tamauchi S, Yokoi A, Yoshikawa N, Nishino K, Yamamoto E, Niimi K, Kajiyama H. Natural-killer-cell-dominant immune landscape and HLA-E-mediated immune evasion. *Placenta*. 174:9-18, 2025.
- 35) Matsuo S, Yokoi A, Ushida T, Yoshida K, Suzuki H, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yamada H, Miki R, Tano S, Imai K, Nagata I, Yasui T, Yamamoto Y, Kajiyama H, Kotani T. LIMCH1-enriched extracellular vesicles promote vascular permeability. *Science Advances*. 12(5):eab8806, 2025.
- 36) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7.
- 37) 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.
- 38) 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. *Equine Vet J*. 144:105233, 2025.
- 39) Hisaeda K, Ono T, Shimokawa-Miyama T, Hata A, Iwata E, Hiasa Y, Ohzawa E, Tozaki T, Murase H, Takasu M, Nishii N, Kitagawa H. Differences in serum iron concentrations between the summer and winter in Noma horses. *J Equine Sci*. 36:1-9, 2025.
- 40) Izumi M, Hano K, Hirata A, Thaw P, Seki A, Tanaka M, Ochi K, Suganami T, Kitagawa H, Takasu M. Glucose and insulin responses following streptozotocin administration in microminipigs. *J Vet Med Sci*. 87: 1122-1127, 2025.
- 41) Hagiwara H, Hayashi Y, Mori K, Hano K, Takasu M, Asai A, Kato K, Tadayoshi Aoyama. Visualizing ambiguity in semantic segmentation of ICSI support systems. *SICE JCMSI*. 18: 2548044, 2025.
- 42) Ohki T, Kitamura K, Tokutake K, Saeki S, Yamamoto M, Takasu M, Hirata H. Depletion of CD169⁺ Border-Associated Macrophages Induces Parkinson's disease-Like Behavior. *Front Neurosci*. 19:1688394, 2025.
- ## 2. 学会発表
- 1) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義. 第 17 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2026 年 2 月.
 - 2) Miki N, Takasu M, et al. IMPLANTABLE ARTIFICIAL KIDNEY FOR HYBRID RENAL REPLACEMENT THERAPY. WCN26. 2026, Yokohama.
 - 3) 七野成之. ゲノム科学の進歩の歴史と、人々の生活や医療への貢献. 第 18 回東京理科大学・野田市・流山市包括連携講演会. 2025 年 12 月 20 日.
 - 4) 七野成之. Biomek i7 による single-cell RNA-seq/T 細胞受容体解析のライブラリ調整自動化の実際. 第 48 回日本分子生物学会年会. 2025 年 12 月 3-5 日.
 - 5) 梅田ゆみ, 山野荘太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変. 第 73 回日本職業災害・医学会学術大会. 2025 年 11 月.
 - 6) 七野成之. シングルセルオミクス解析法 TAS-Seq ファミリーの開発と疾患研究への応用. 2025 年度データサイエンス医療研究・統計科学研究合同シンポジウム. 2025 年 11 月 29 日.
 - 7) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生. 日本産業衛生学会 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025 年 10 月.
 - 8) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出. フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2025 年 9 月.
 - 9) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは? 文科省学術変革領域研究 2025 年度若手支援技術講習会. 2025 年 9 月.
 - 10) Umeda Y, Takasu M, Shichino S, Yamamoto Y, Yamano S, et al. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025). 2025 Sep.
 - 11) 神田光輝, 七野成之, 高須正規, et al. RNA-seq を用いたブタ単為発生胚盤胞と生体内受精胚盤

- 胞の比較. 第 169 回日本獣医学会. 2025 年 9 月 (優秀発表賞).
- 12) 齊藤海星, 高須正規, et al. マイクロミニピッグの腔マイクロバイオーム解析. 第 169 回日本獣医学会. 2025 年 9 月.
 - 13) 吉原健太郎, 山本雄介, et al. En bloc TUR 検体を用いた空間トランスクリプトーム解析による膀胱癌の浸潤機構の解明. 日本ヒト細胞学会学術集会 第 43 回. 2025 年 9 月.
 - 14) 山元智史, 山本雄介, et al. 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の検討. 日本分子腫瘍マーカー研究会 第 45 回. 2025 年 9 月.
 - 15) 大嶋一輝, 山本雄介, et al. 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 第 45 回. 2025 年 9 月.
 - 16) 大嶋一輝, 山本雄介, et al. *Klebsiella pneumoniae* 由来 tsRNA の肝がん発がんに与える影響. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 17) プリエトビラ マルタ, 山本雄介, et al. シングルセル解析による原発腫瘍細胞の稀少サブクローンにおける転移関連遺伝子発現シグネチャ. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 18) 鈴木公基, 山本雄介, et al. 高悪性度漿液性卵巣癌における細胞間クロストークを介した薬剤耐性を解明するための空間的解析. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 19) 片山翔太, 山本雄介, et al. 乳がんにおける HER2 発現の動的変化とその意義の解明. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 20) 吉原健太郎, 山本雄介, et al. 副腎癌の RNA-seq と exome-seq による病因解明. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 21) 安岡いるま, 山本雄介, et al. 乳がんの休眠制御に関わる遺伝子ネットワーク解析. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 22) 武井祐樹, 山本雄介, et al. E-cadherin の点変異や核局在がもたらす entosis への影響. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 23) 都倉桃子, 山本雄介, et al. 空間トランスクリプトーム解析による古典型浸潤性小葉がん和多形型の比較. 日本癌学会総会 第 84 回. 2025 年 9 月.
 - 24) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による職業性肺疾患研究の新展開. 第 13 回日本繊維状物質研究学術集会. 2025 年 8 月 (招待講演).
 - 25) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変. 第 42 回エアロゾル科学・技術研究討論会. 2025 年 8 月.
 - 26) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. 第 38 回発癌病理研究会. 2025 年 8 月.
 - 27) 鈴木公基, 山本雄介, et al. 高異型度漿液性卵巣癌における薬剤耐性機構を解明するための空間解析. 日本婦人科腫瘍学会 第 67 回. 2025 年 7 月.
 - 28) 安岡いるま, 山本雄介, et al. 乳がん休眠を制御する遺伝子ネットワークの解析. 日本がん転移学会学術集会 第 34 回. 2025 年 6 月.
 - 29) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する. 第 98 回日本産業衛生学会. 2025 年 5 月.
 - 30) 高須正規. マイクロミニピッグをプラットフォームとした再生医療研究. 2025 年度 One Medicine 創薬シーズ開発・育成研究教育拠点シンポジウム.
 - 31) 高須正規. ミニブタを用いた臓器再生プラットフォームの構築. 東海小児腎臓病理研究会.

G. 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

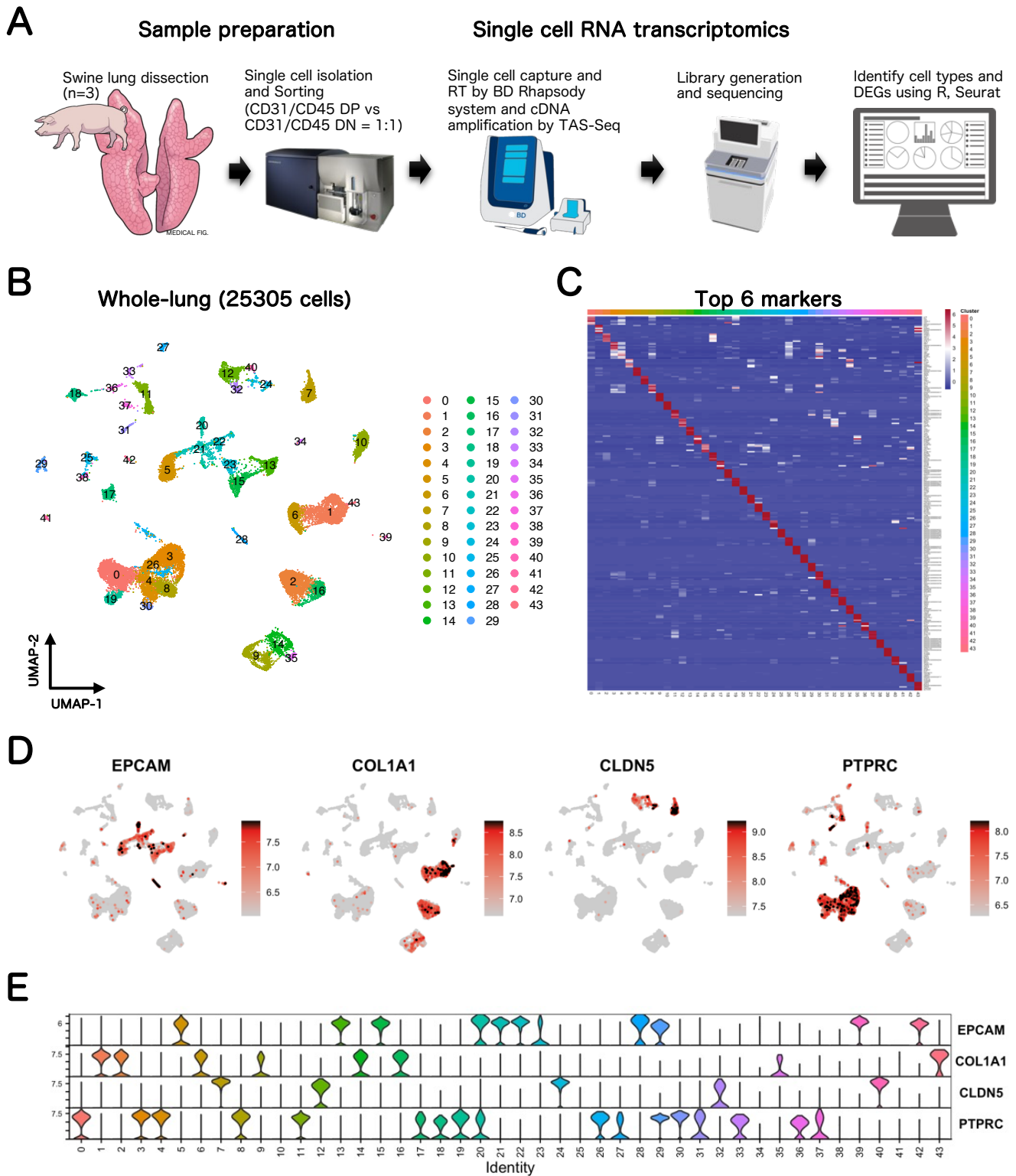


図1 正常マイクロミニピッグ肺の1細胞解析概要

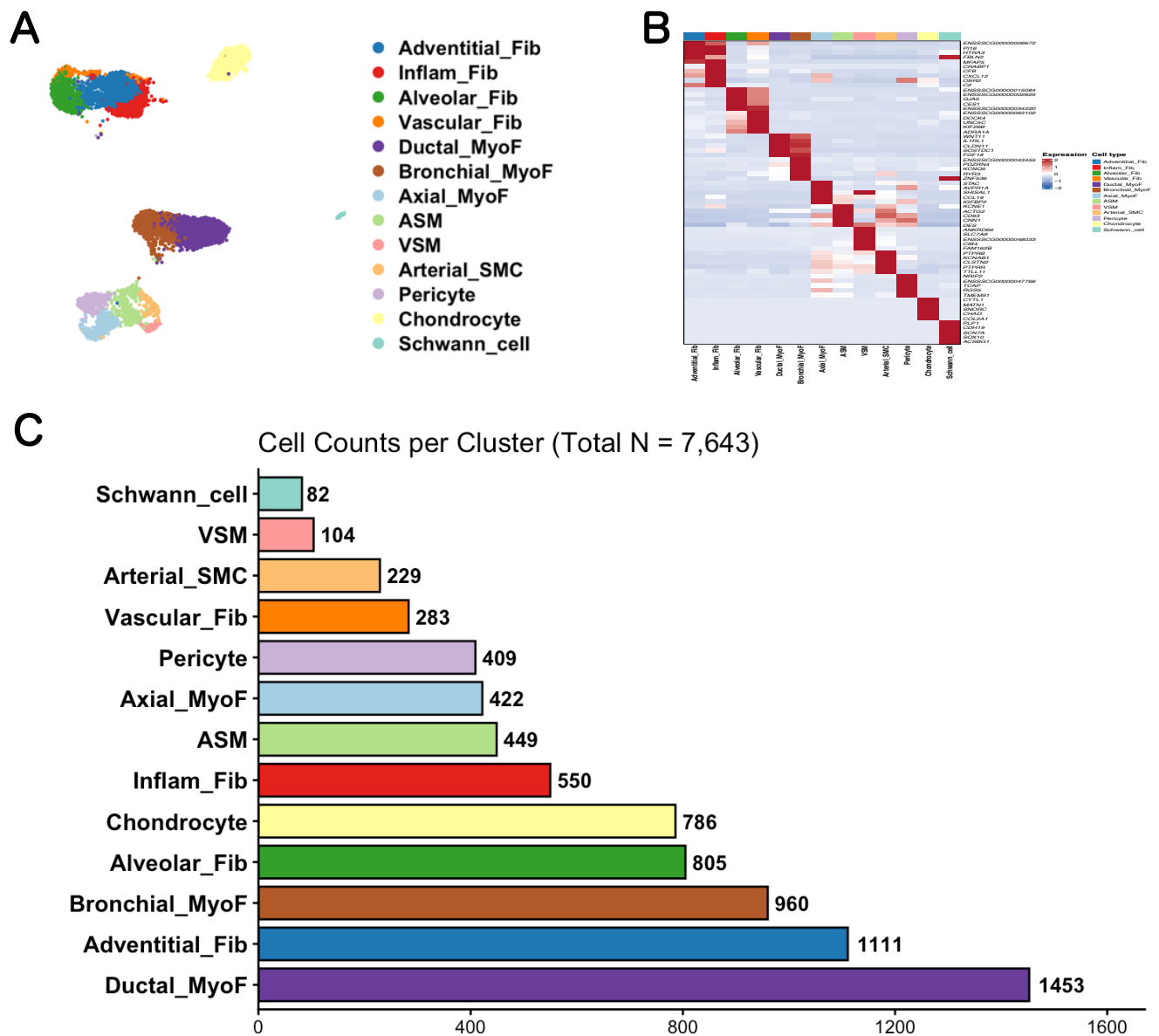
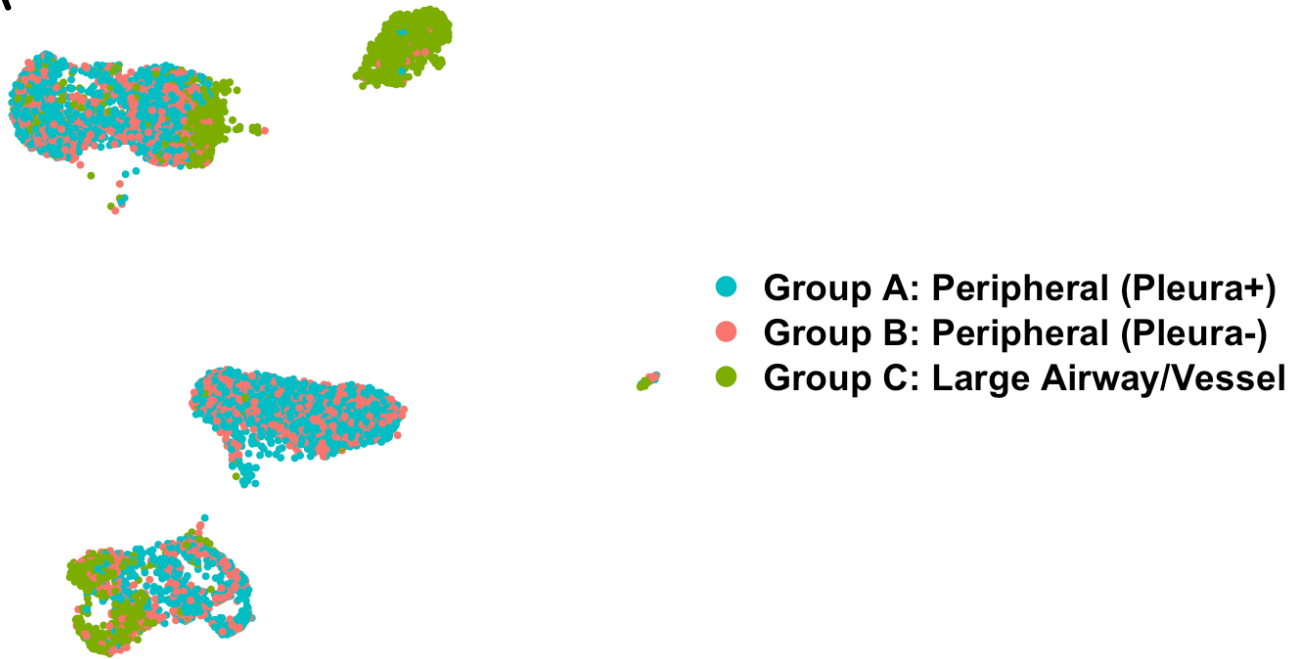
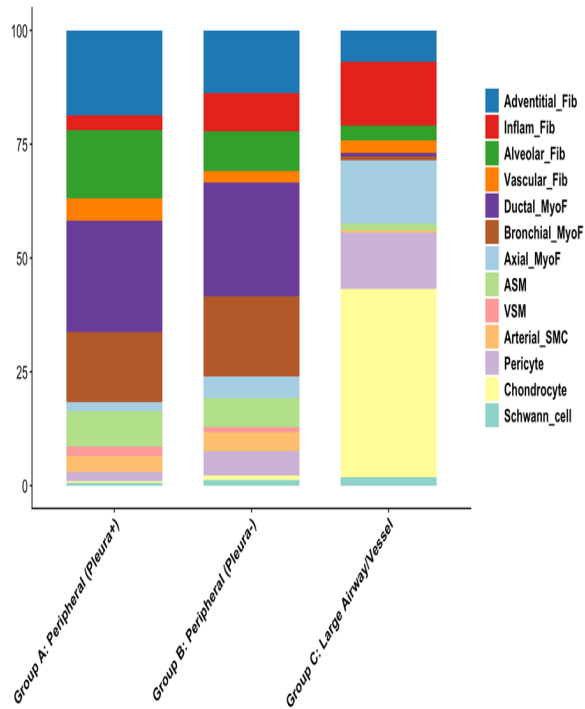


図2 COL1A1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

A



B



C

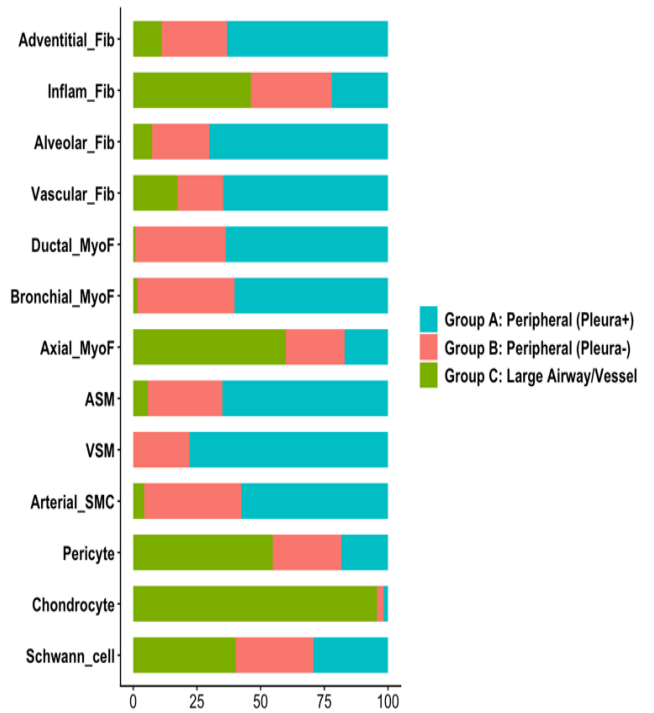


図3 サンプル領域ごとの割合

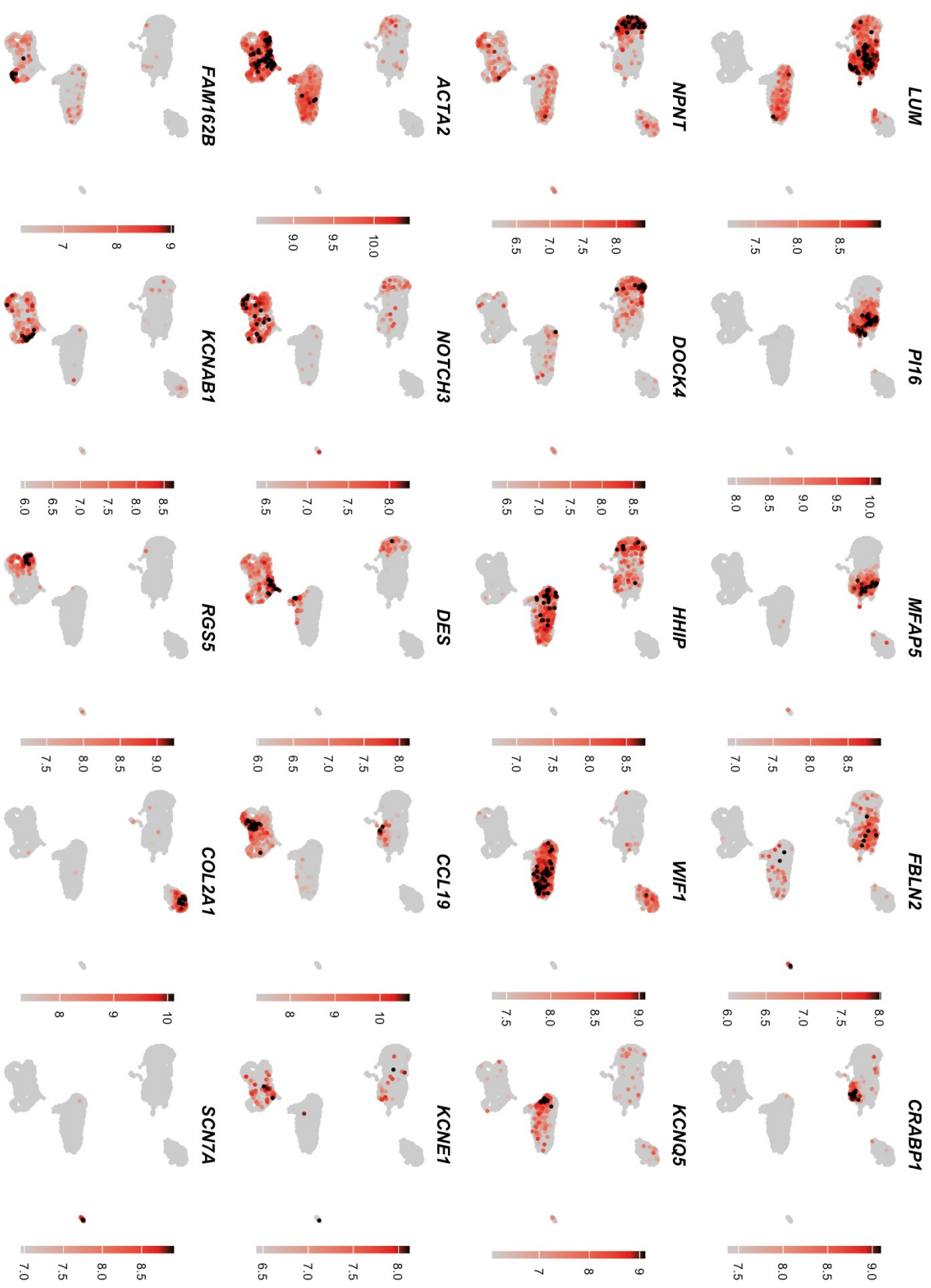


図 4 ツーカラー遺伝子を用いたFeaturePlot

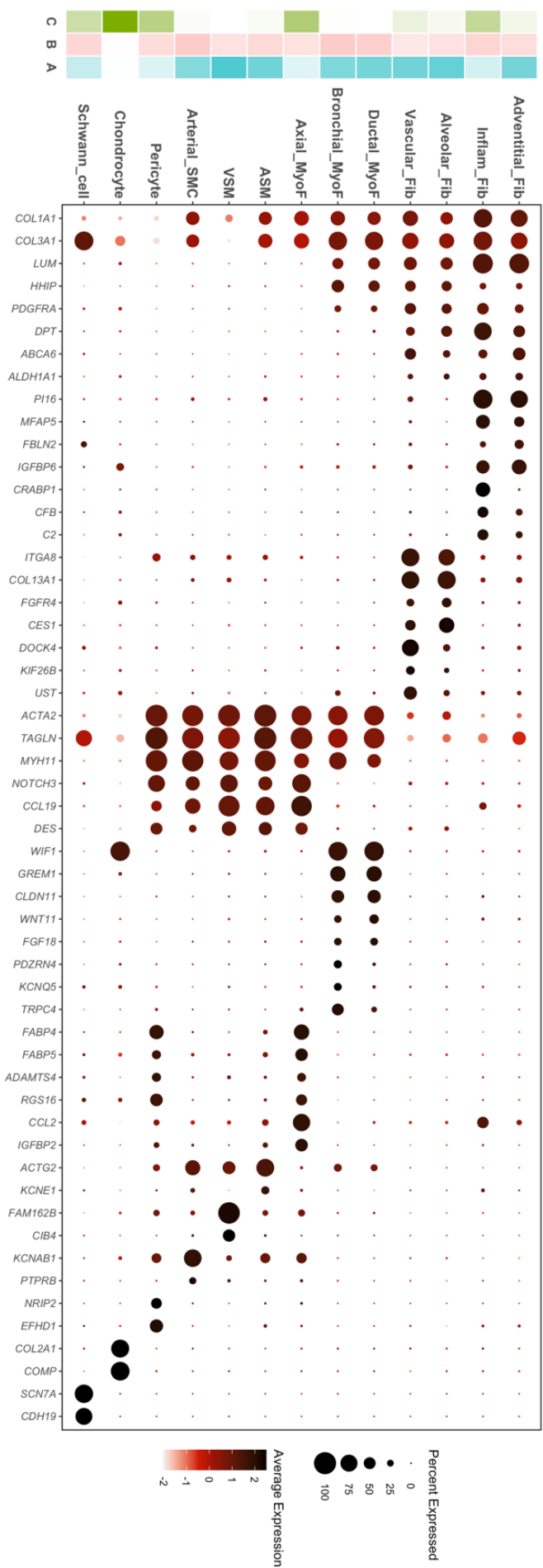
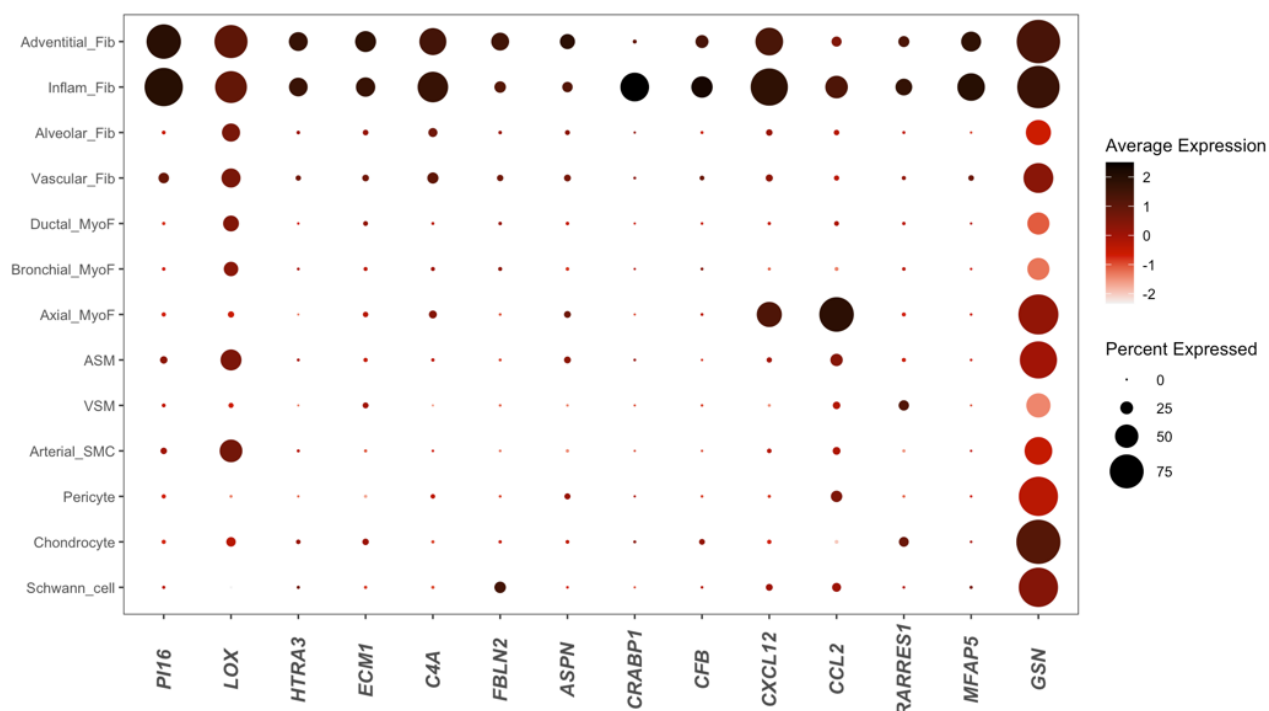


図5 マーカー遺伝子を用いたDotplot

A



B

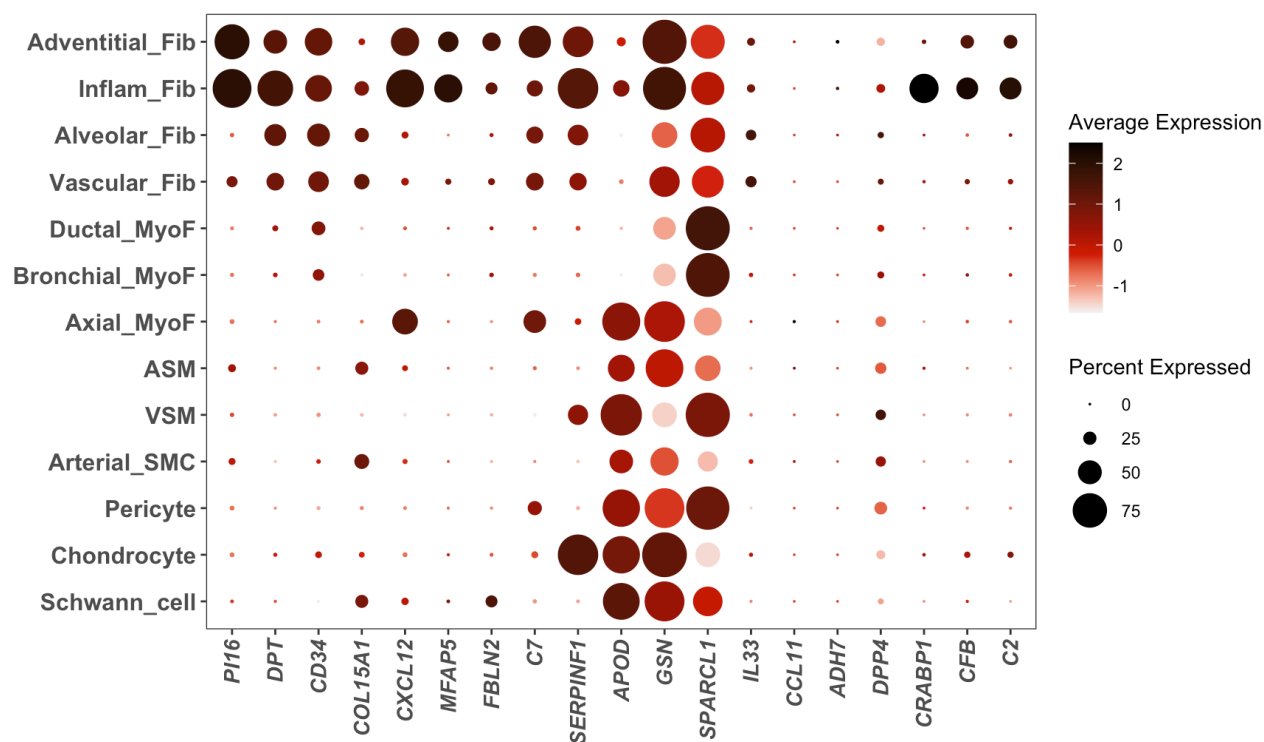


図6 AdvF/InflamFの遺伝子シグネチャー特徴

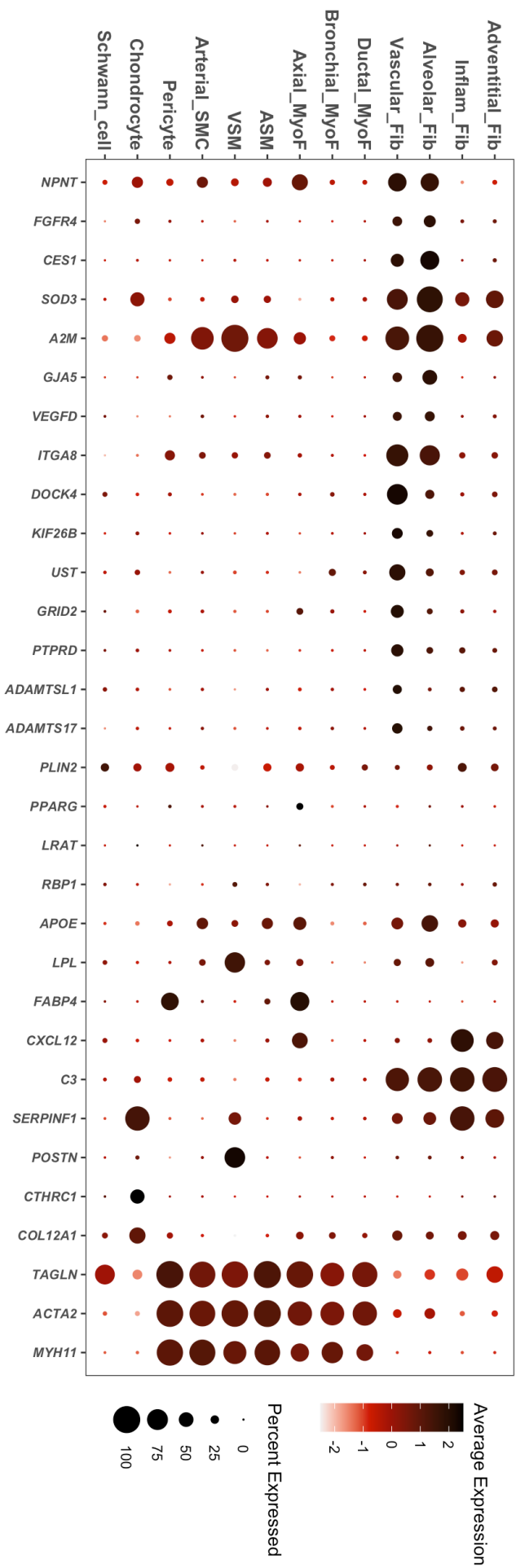


図7 AlVFの遺伝子シグネチャー特徴

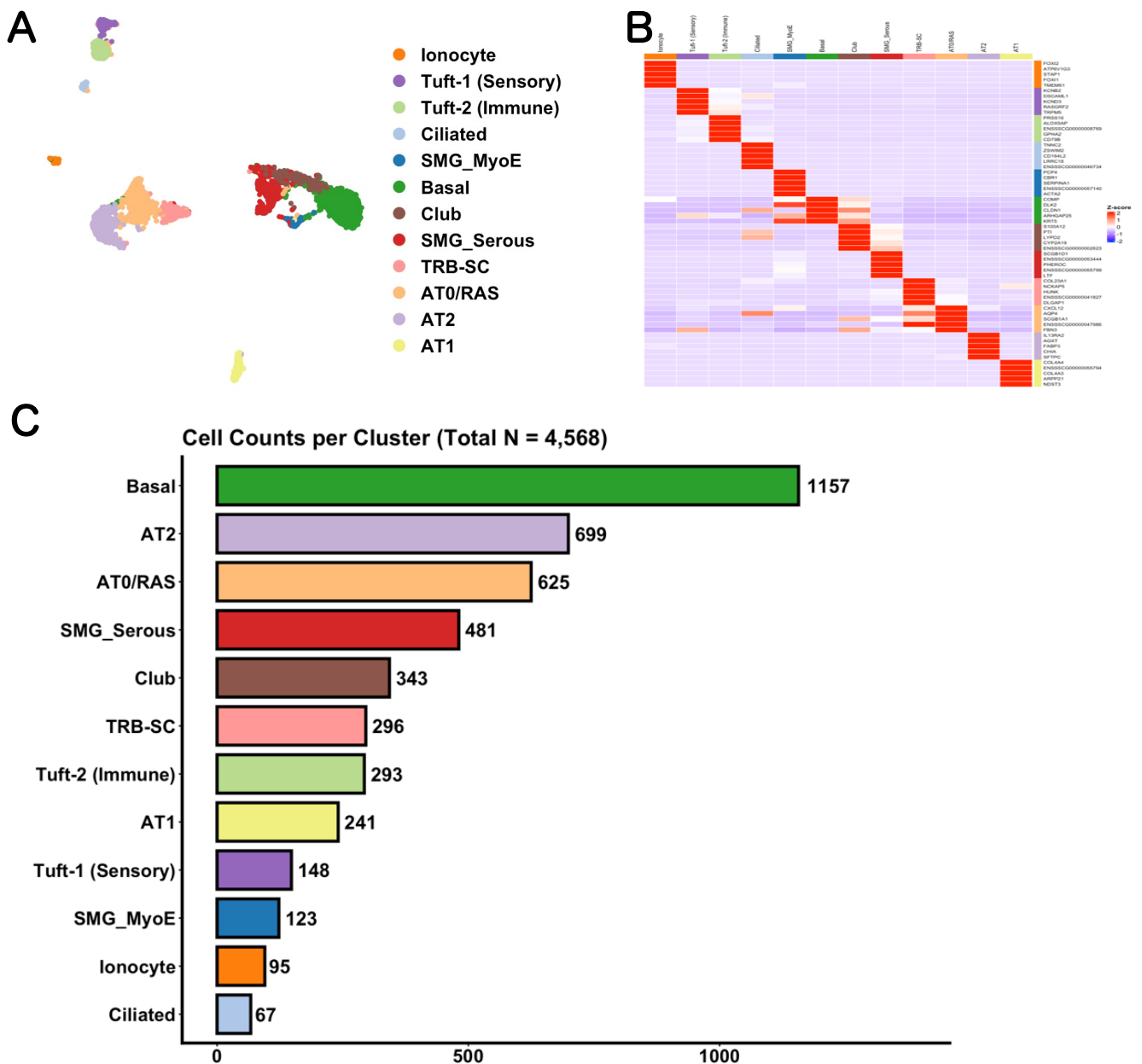


図8 EPCAM/CDH1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

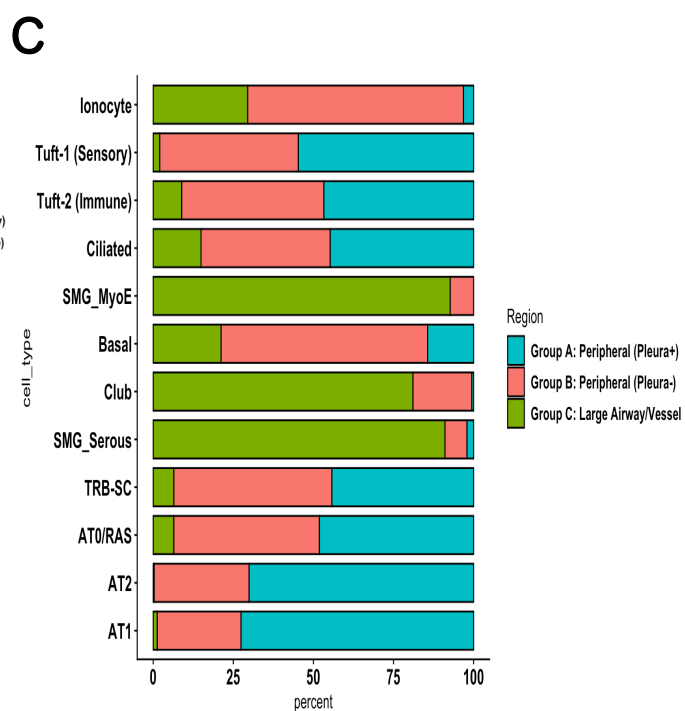
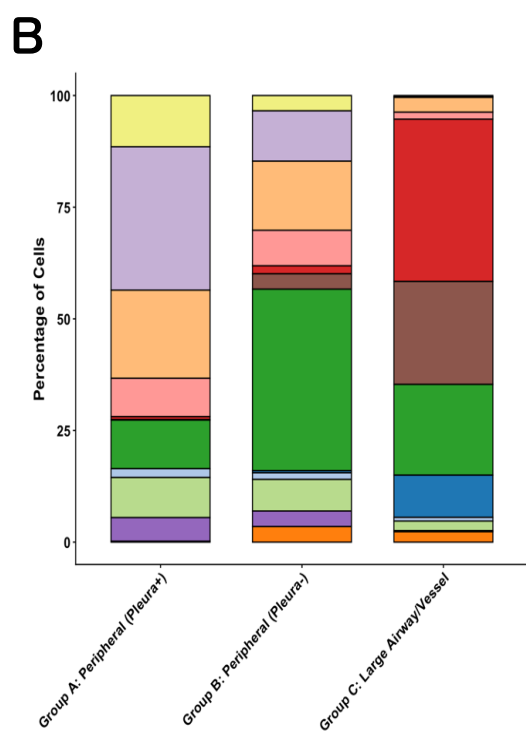
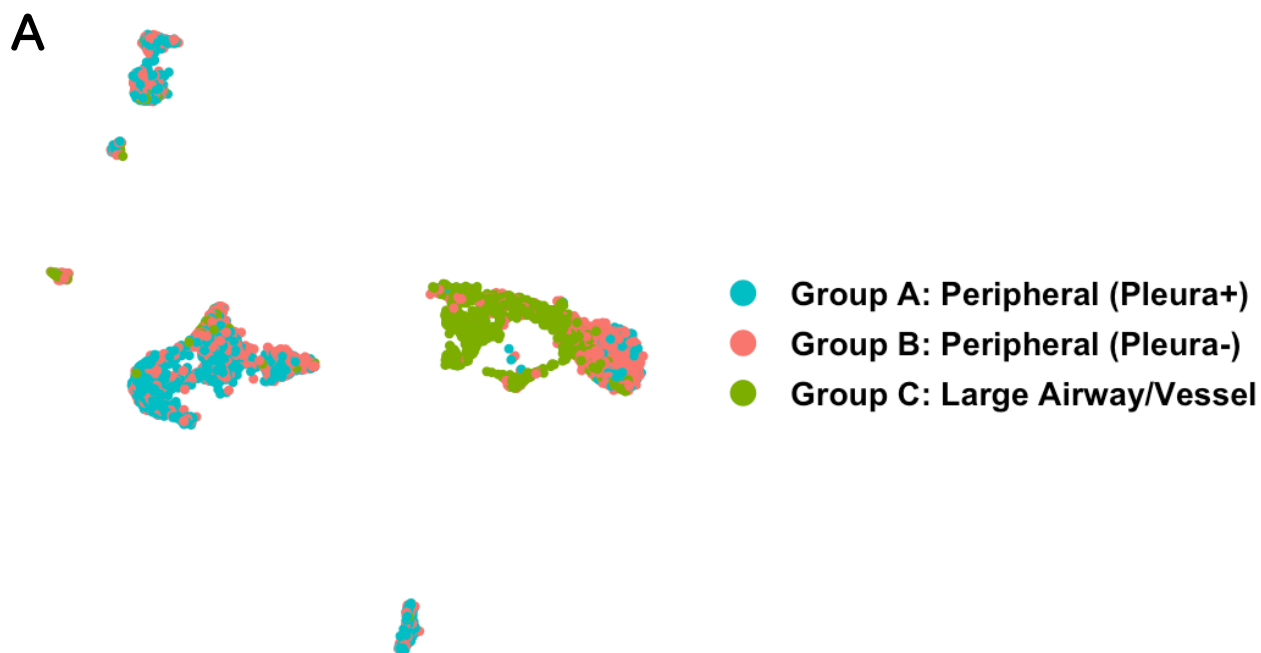


図9 サンプルング領域ごとの割合

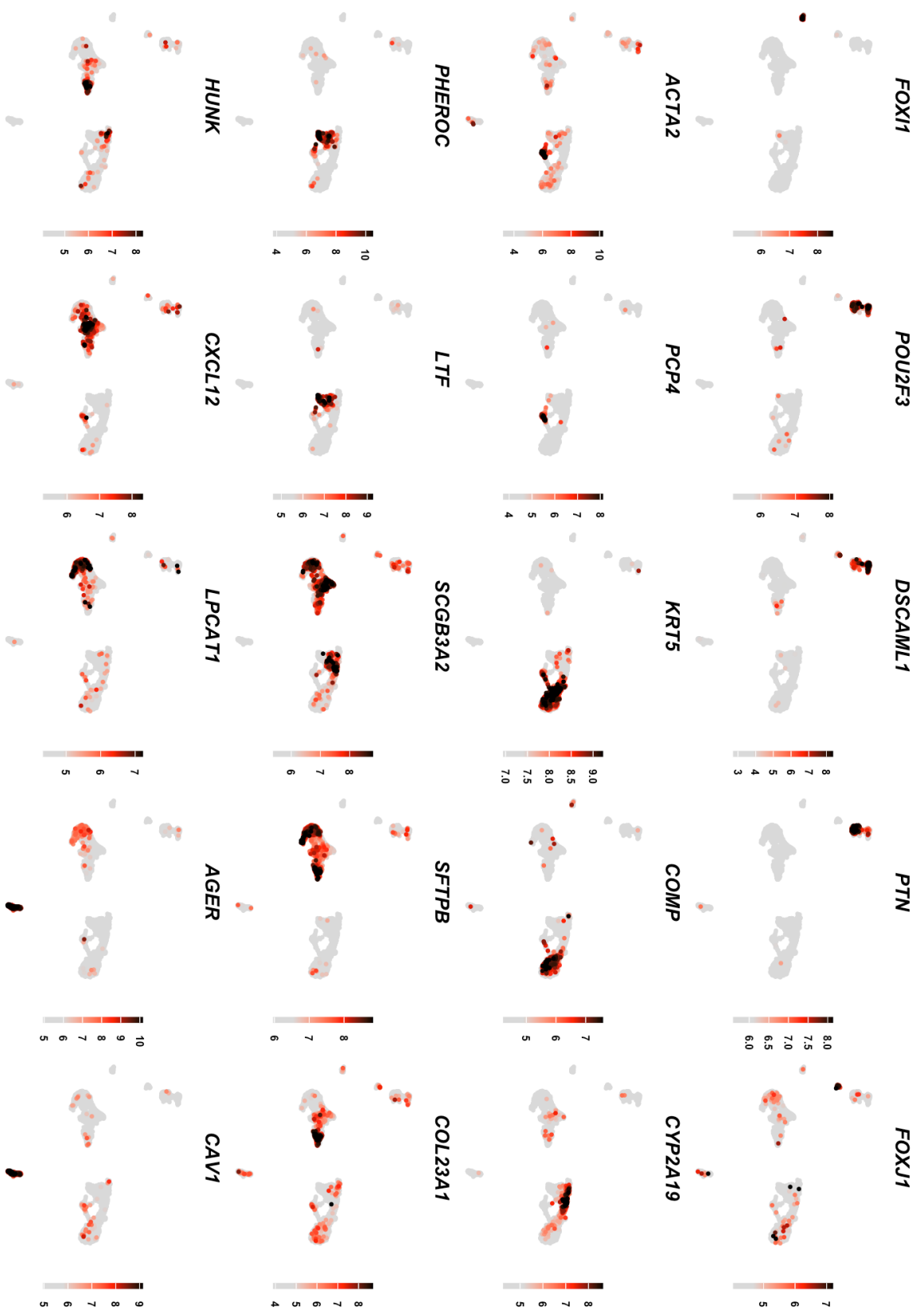


図10 マーカー遺伝子を用いたFeaturePlot

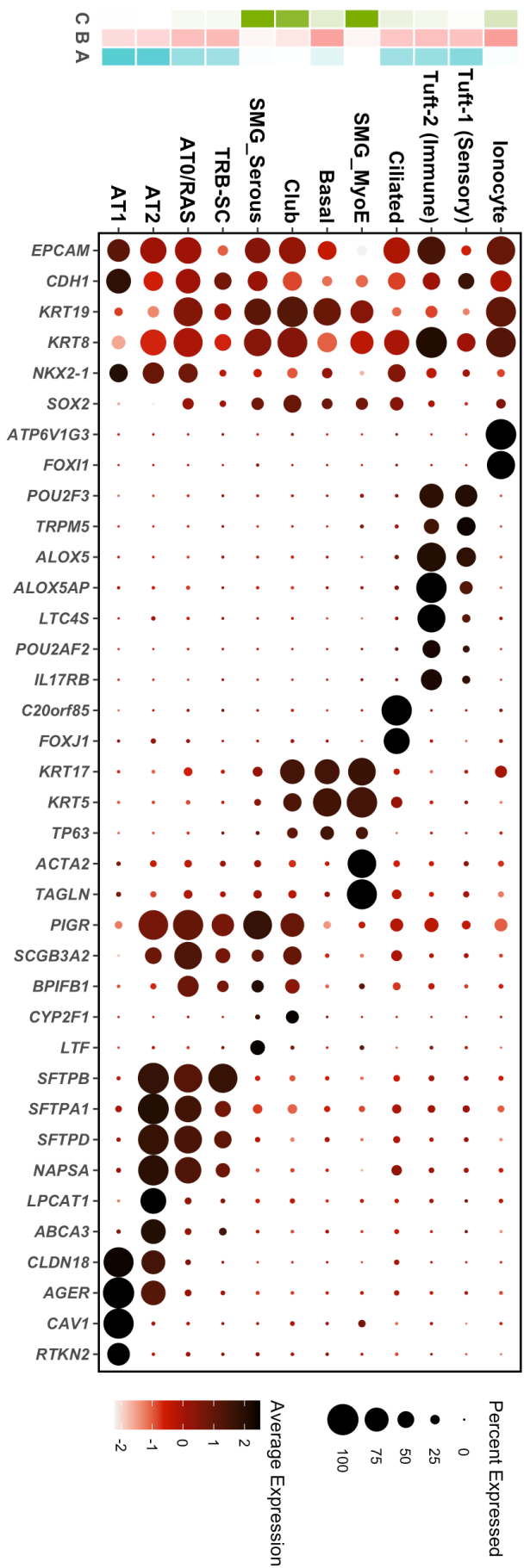


図11 マーカー遺伝子を用いたDotplot

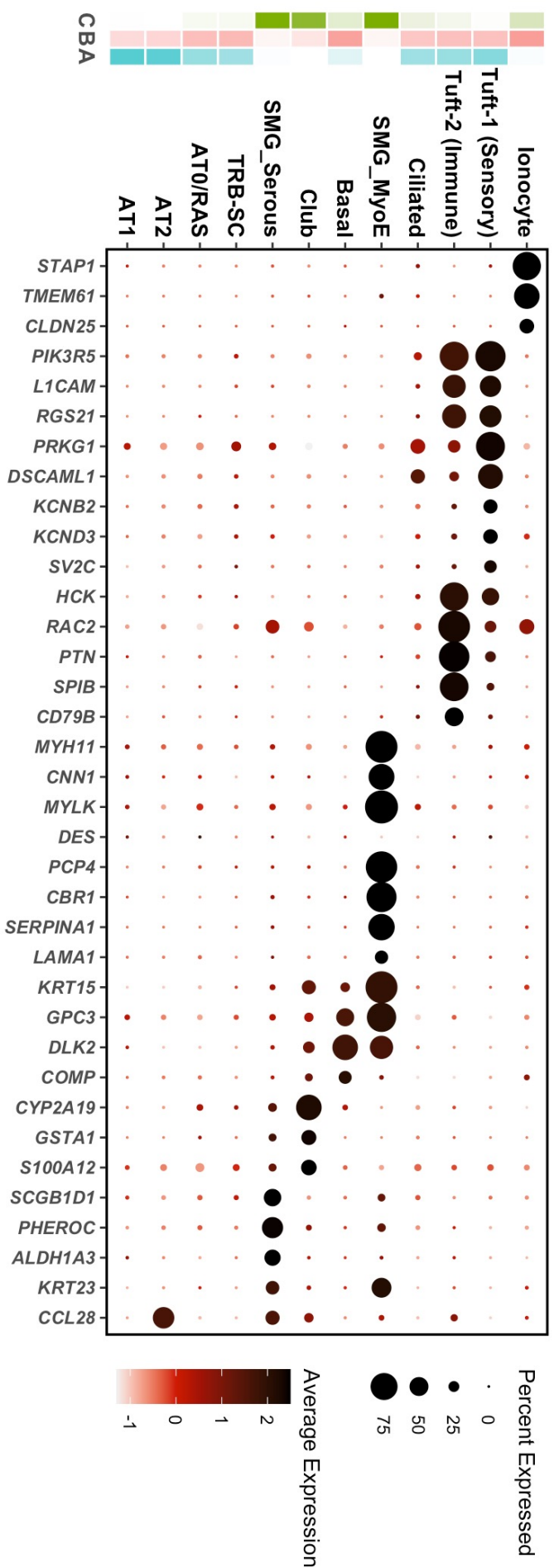
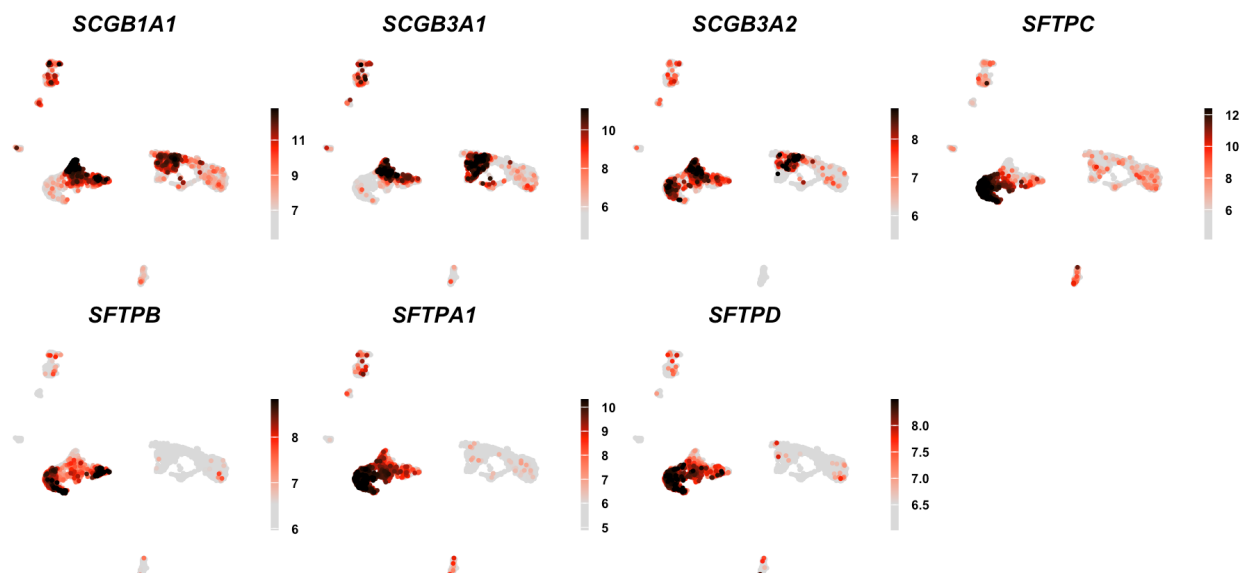


図12 Ionocyte, Tuft1/2, SMG, Basal, Clubに関する追加マーカー

A



B

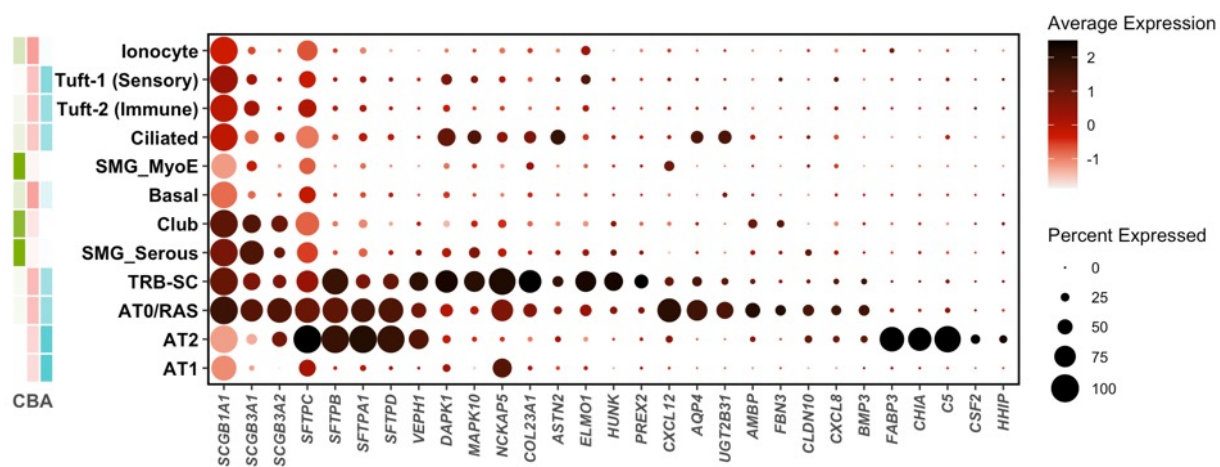


図13 TRB-SC, AT0/RAS, AT2に関する追加データ

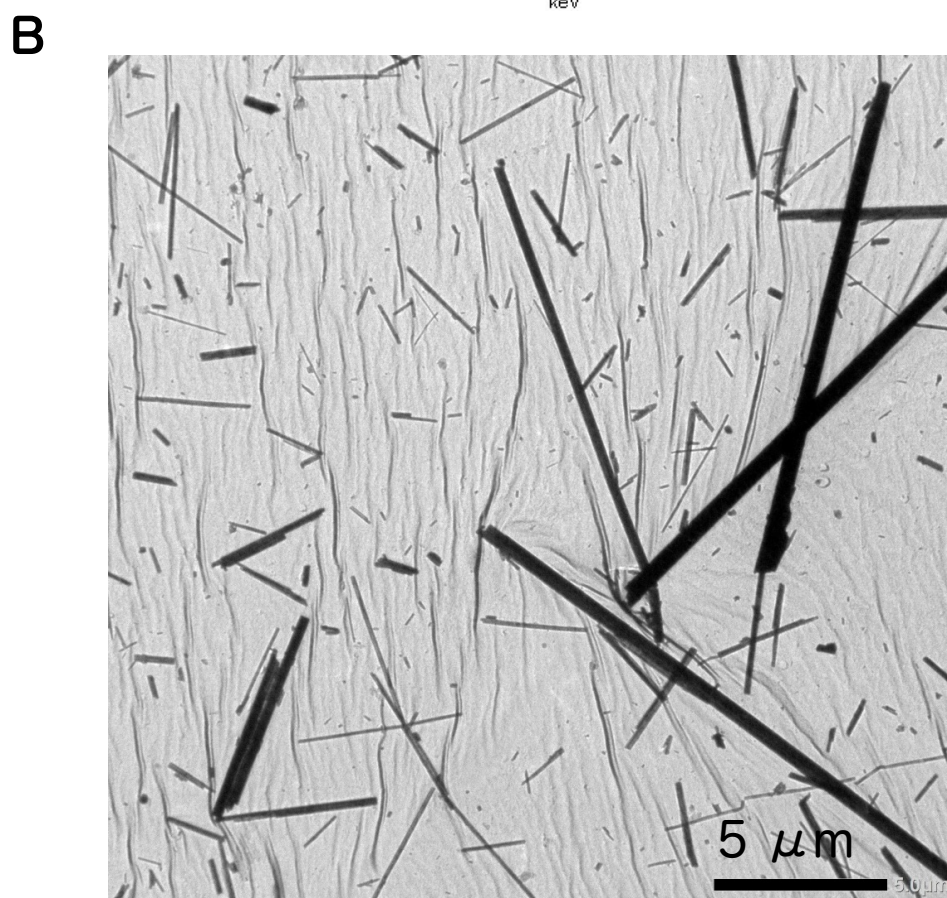
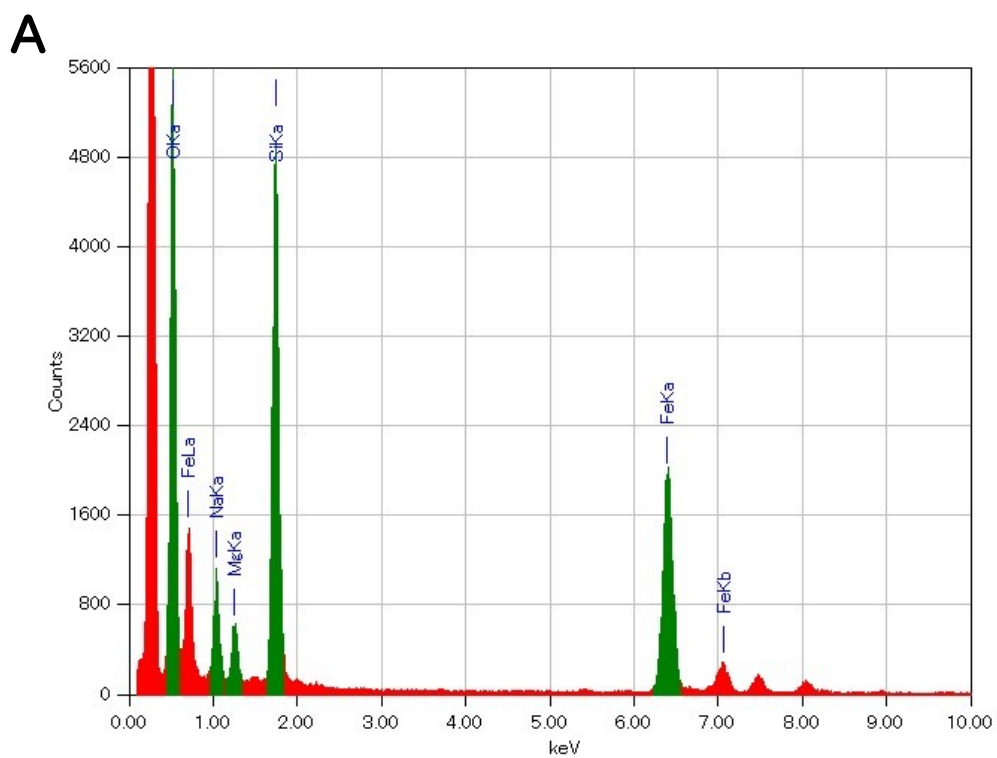
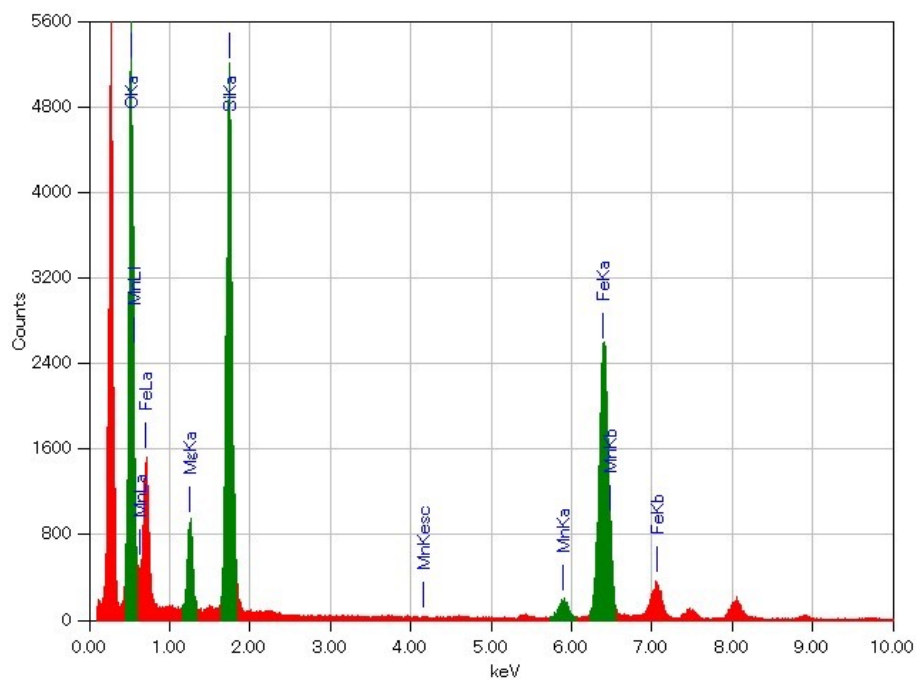


図14 クロシドライト線維のEDS結果及びTEMによる線維画像

A



B

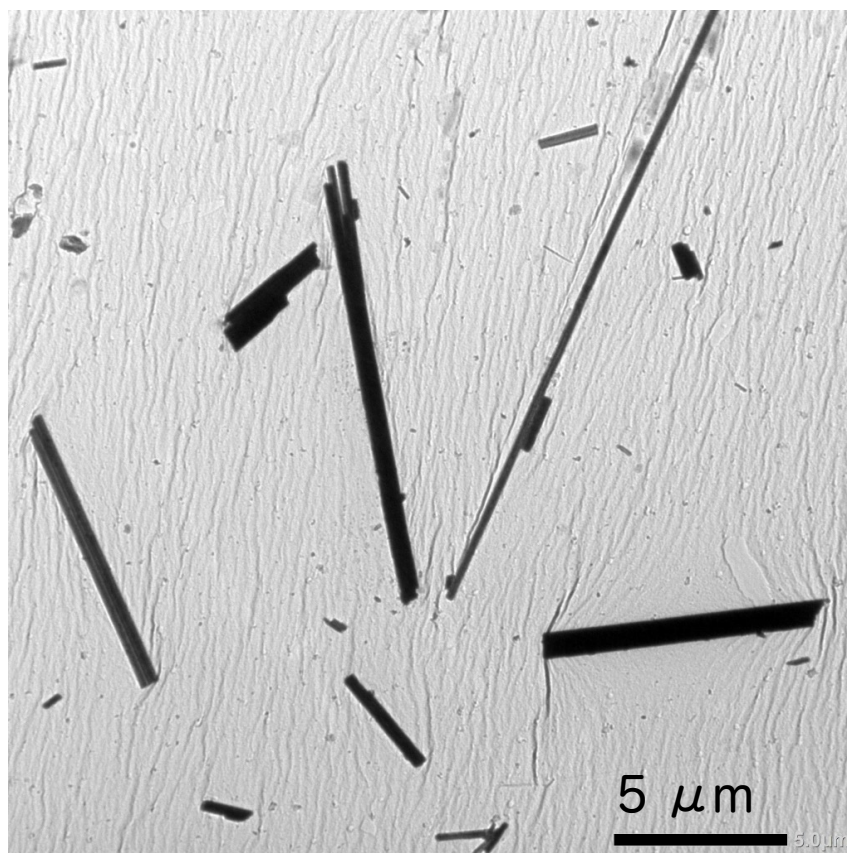


図15 アモサイト線維のEDS結果及びTEMによる線維画像

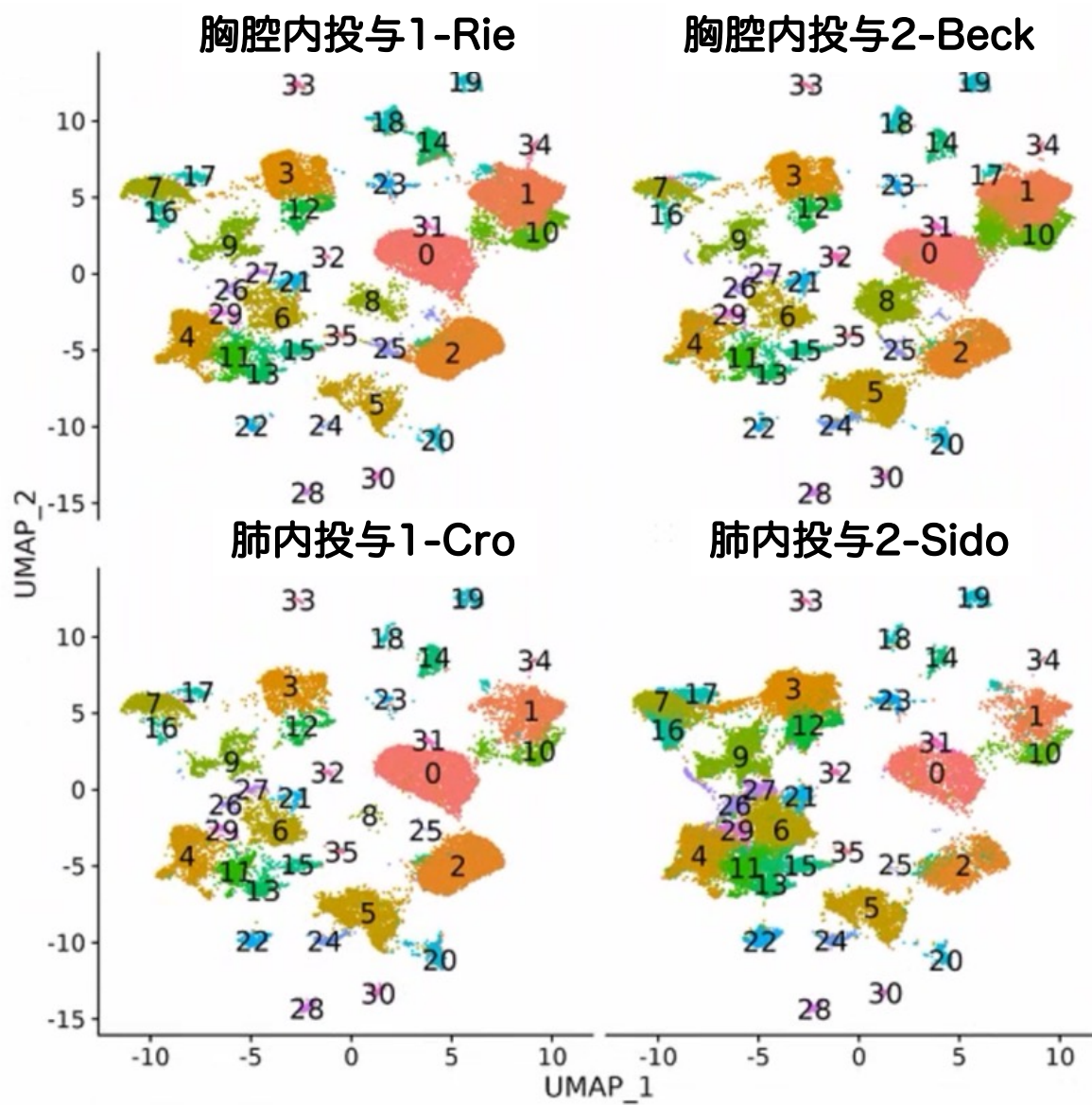


図 16 石綿投与ブタ4頭のscRNA-seq解析

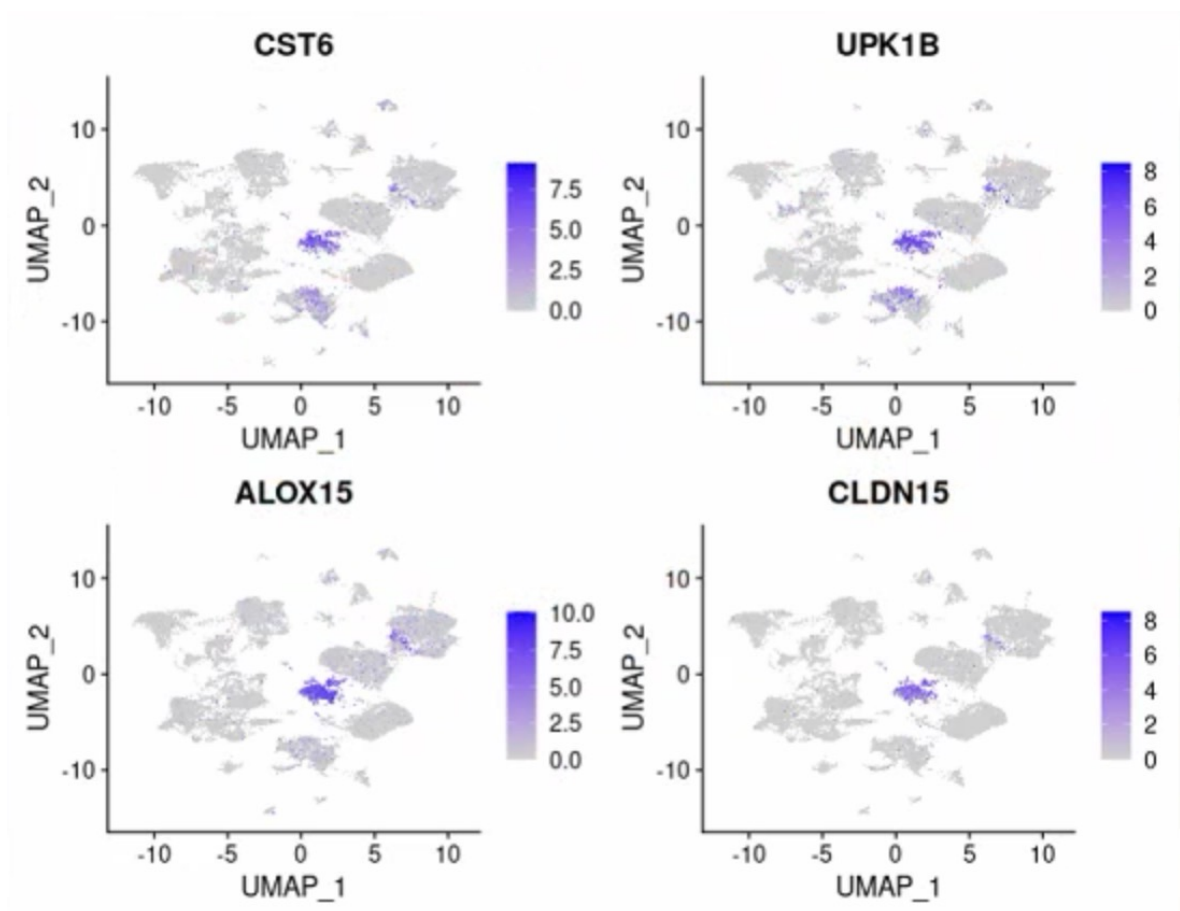


図17 中皮細胞マーカー遺伝子の発現パターン

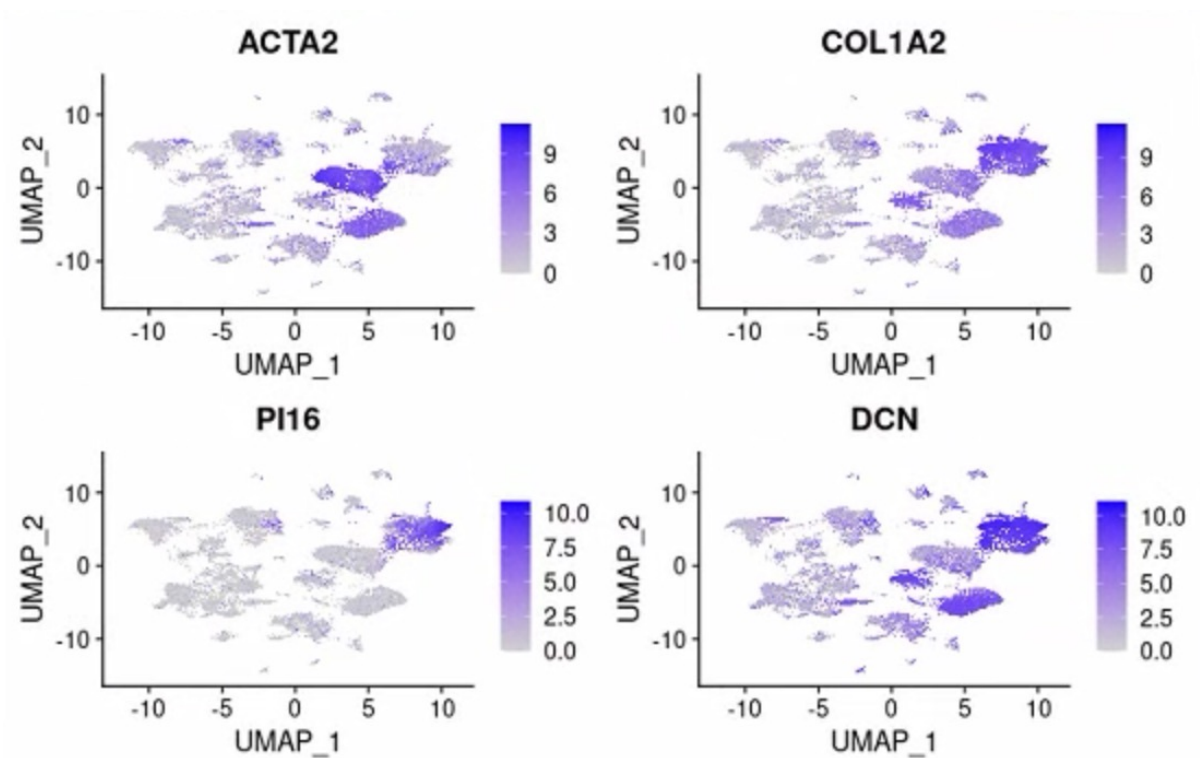


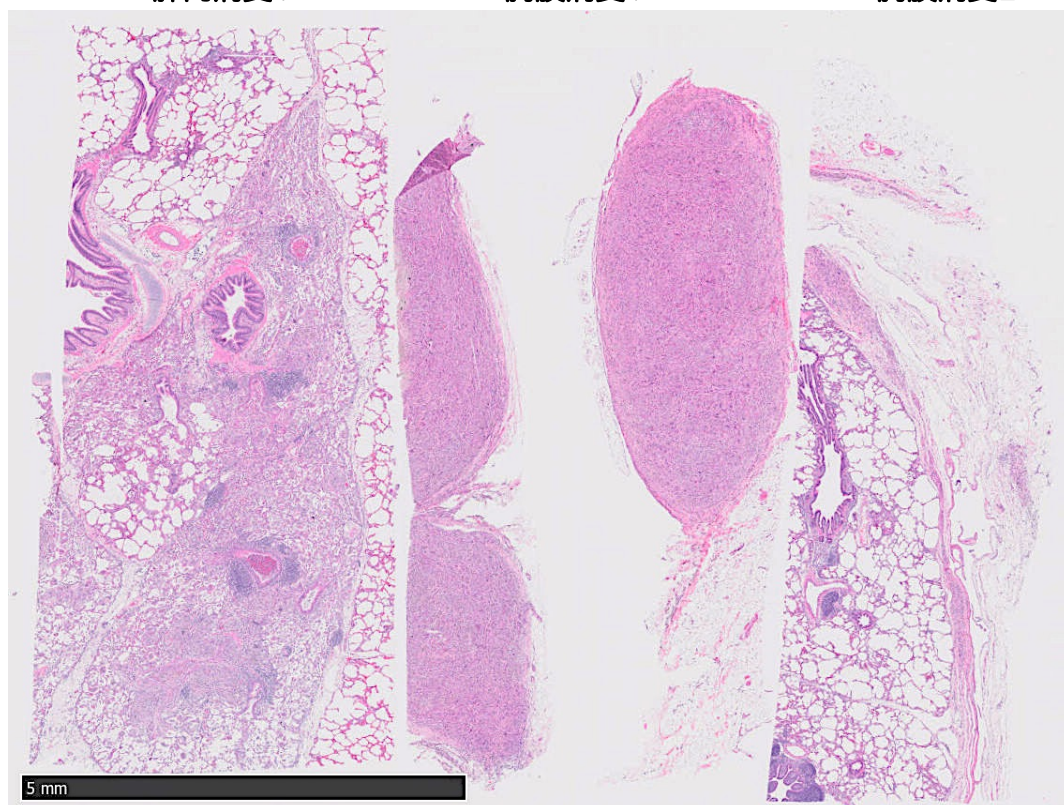
図18 外膜線維芽細胞マーカー遺伝子と線維芽細胞活性化遺伝子の発現パターン

A

肺内病变1

胸膜病变1

胸膜病变2



B

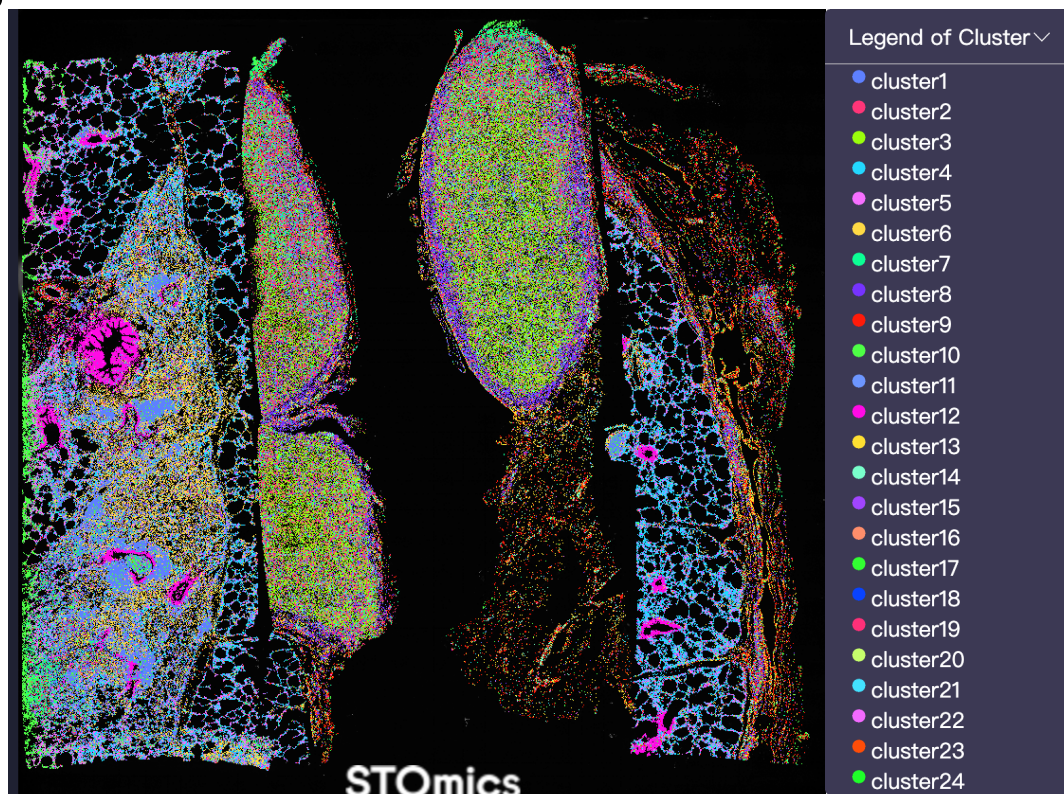


図19 石綿投与ブタ2頭の空間遺伝子発現解析

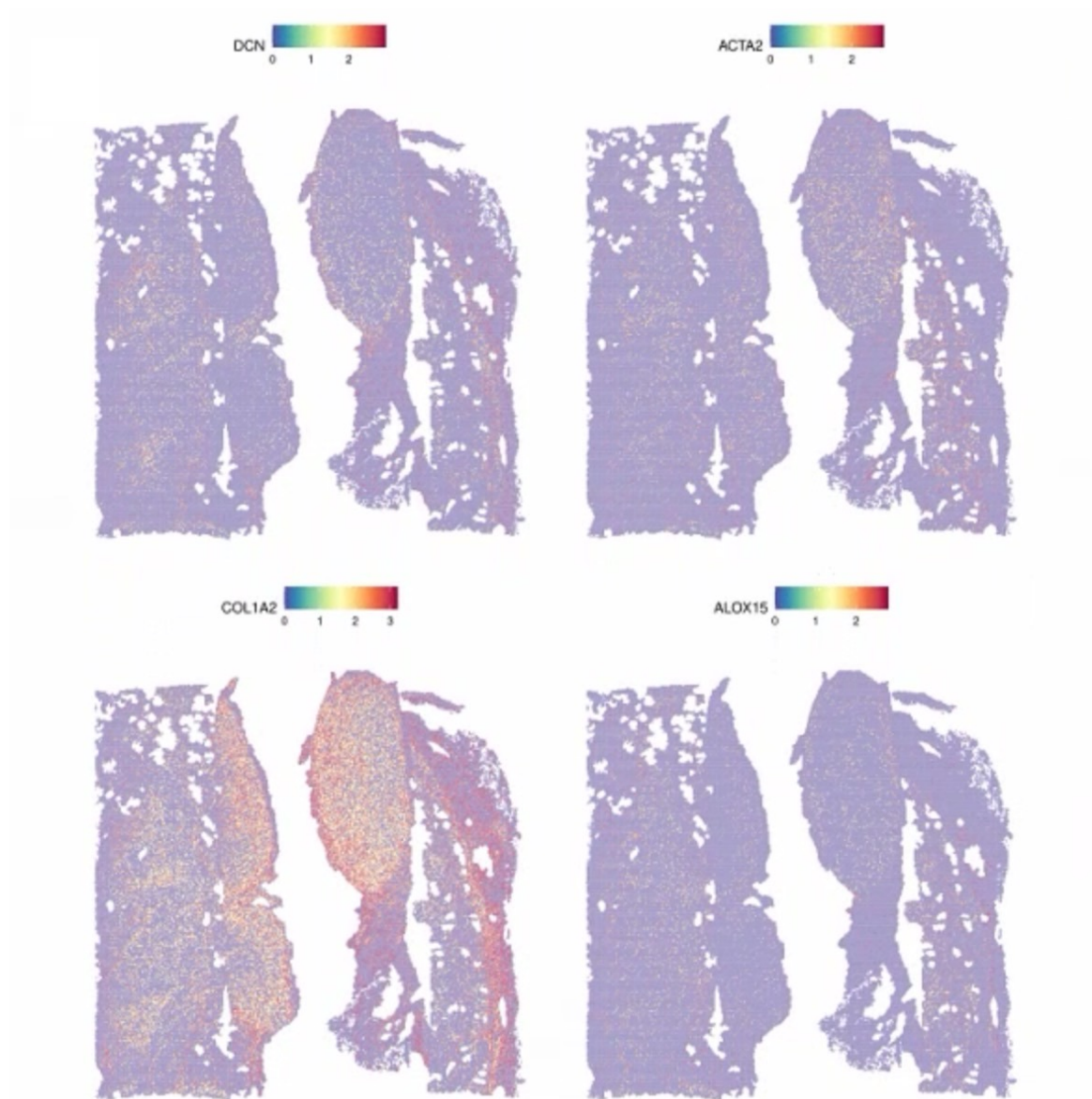


図20 石綿投与ブタの空間遺伝子発現解析
(DCN, ACTA2, COL1A2, ALOX15)

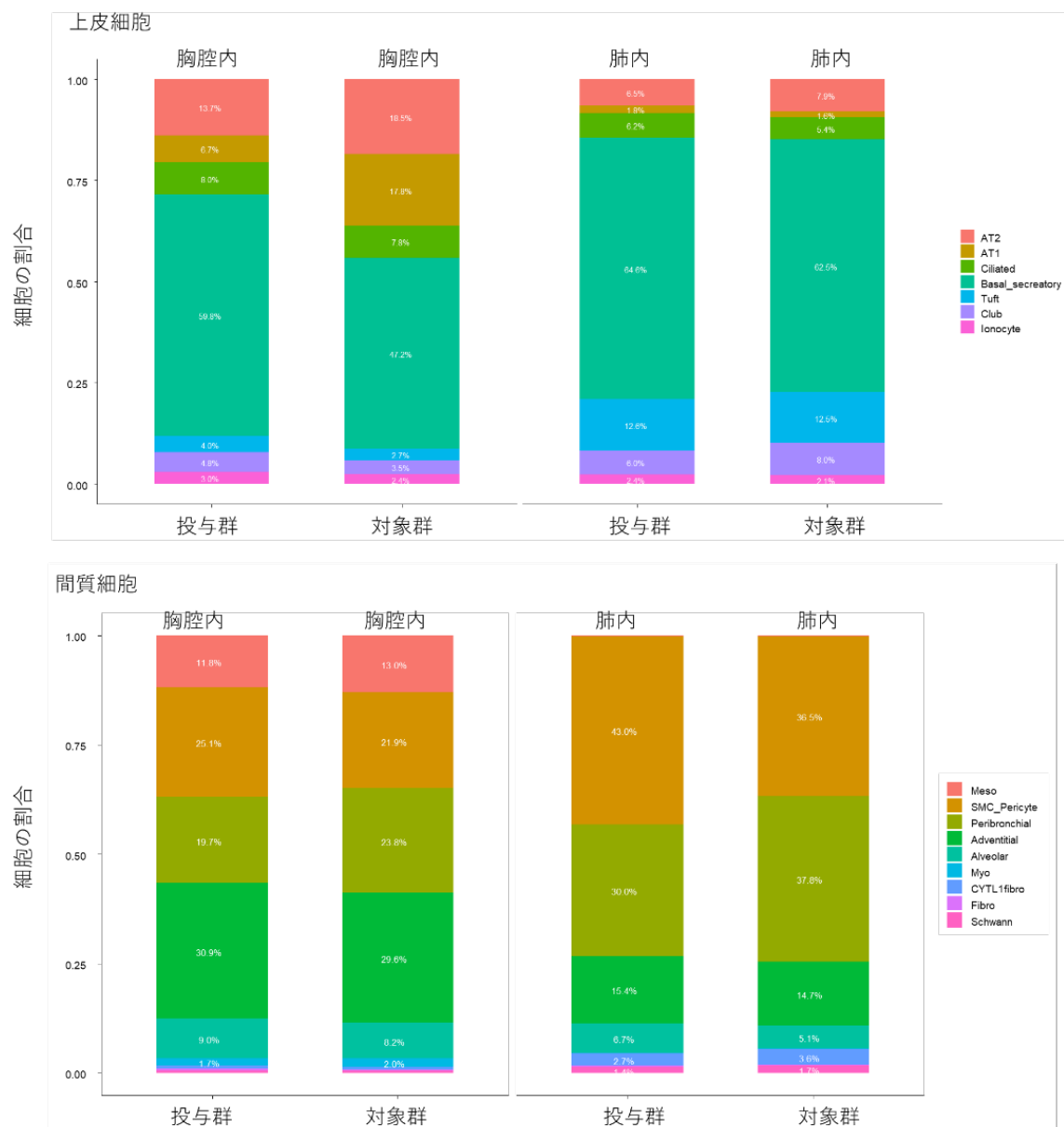


図2 1 青石綿投与による細胞集団の割合の変化

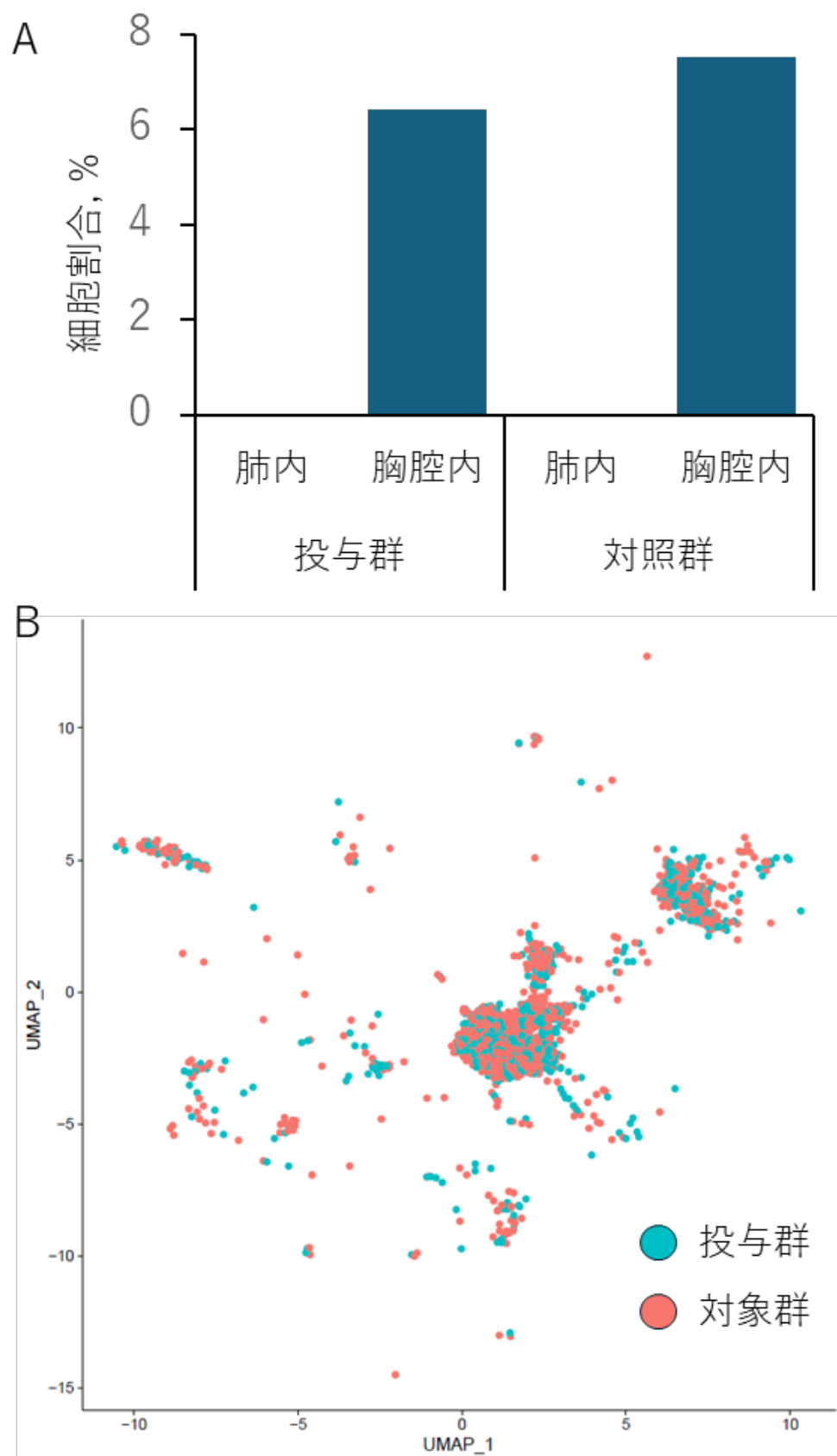


図22 青石綿投与・対照群の中皮細胞の割合

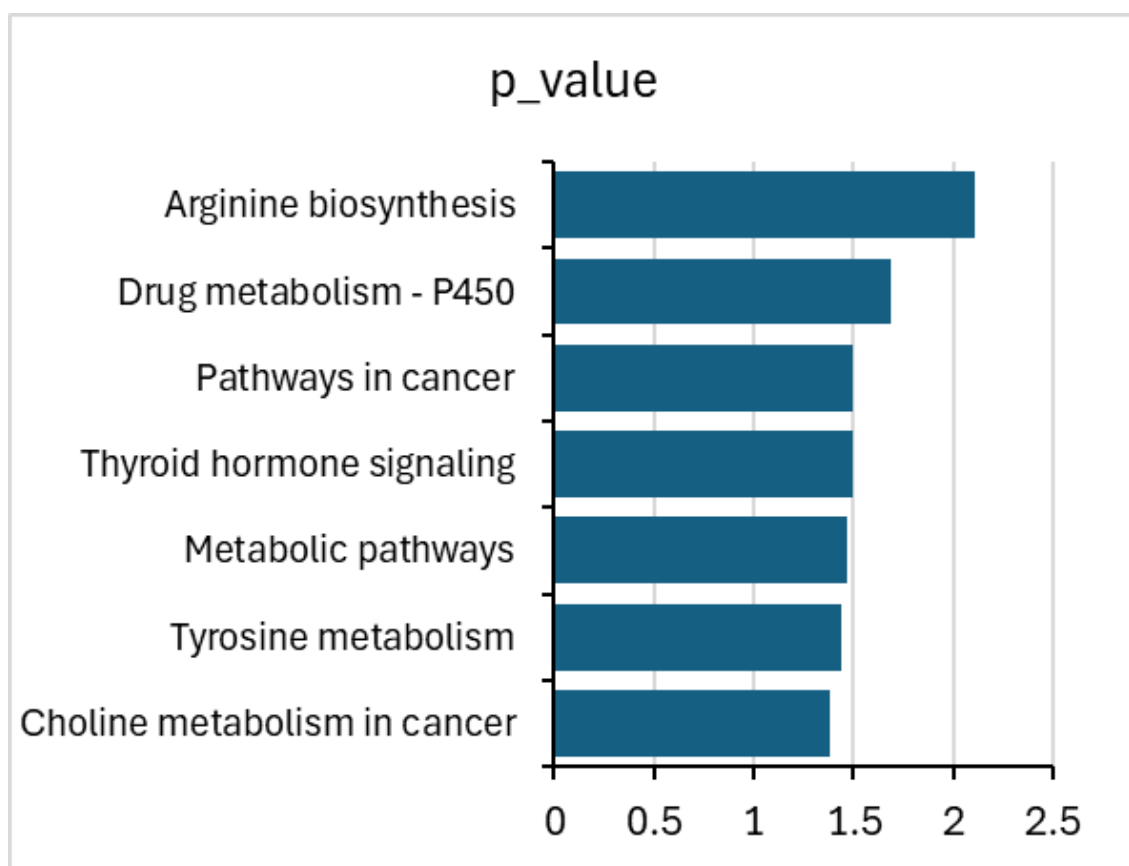


図23 青石綿投与による中皮細胞内のパスウェイ解析

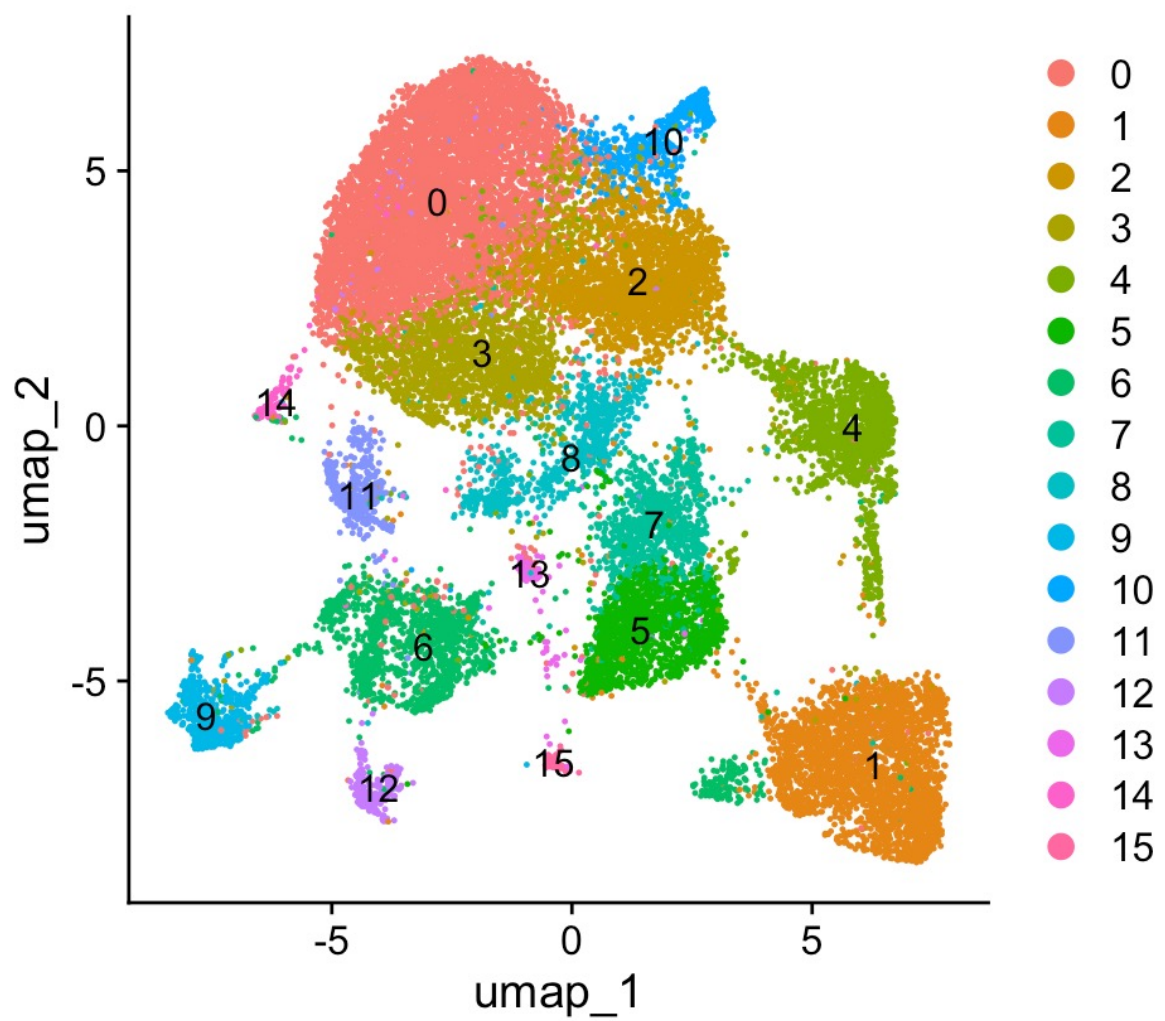


図24 PI16陽性細胞のみでのサブクラスター解析

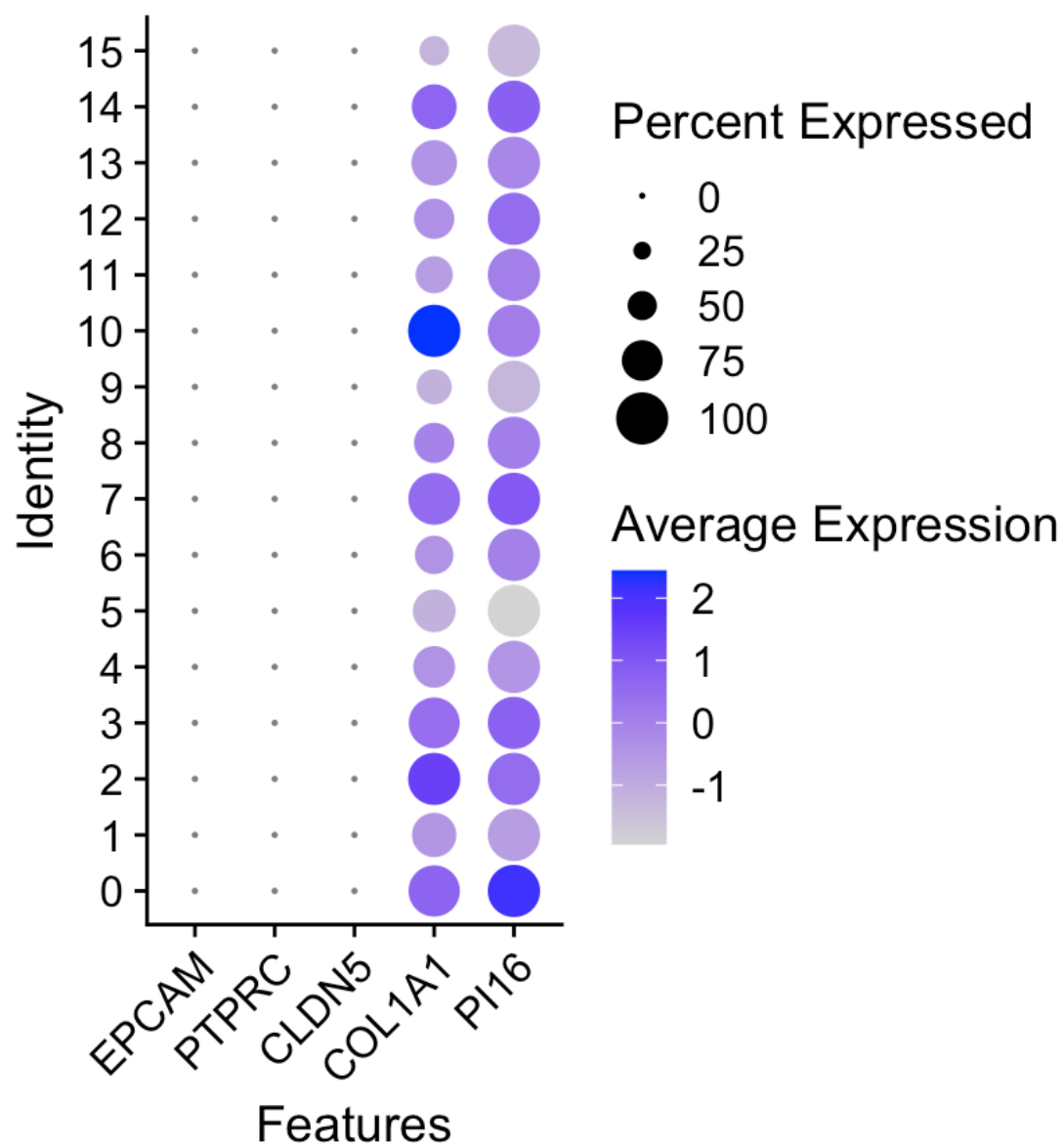


図25 PI16陽性細胞16クラスターのマーカー発現

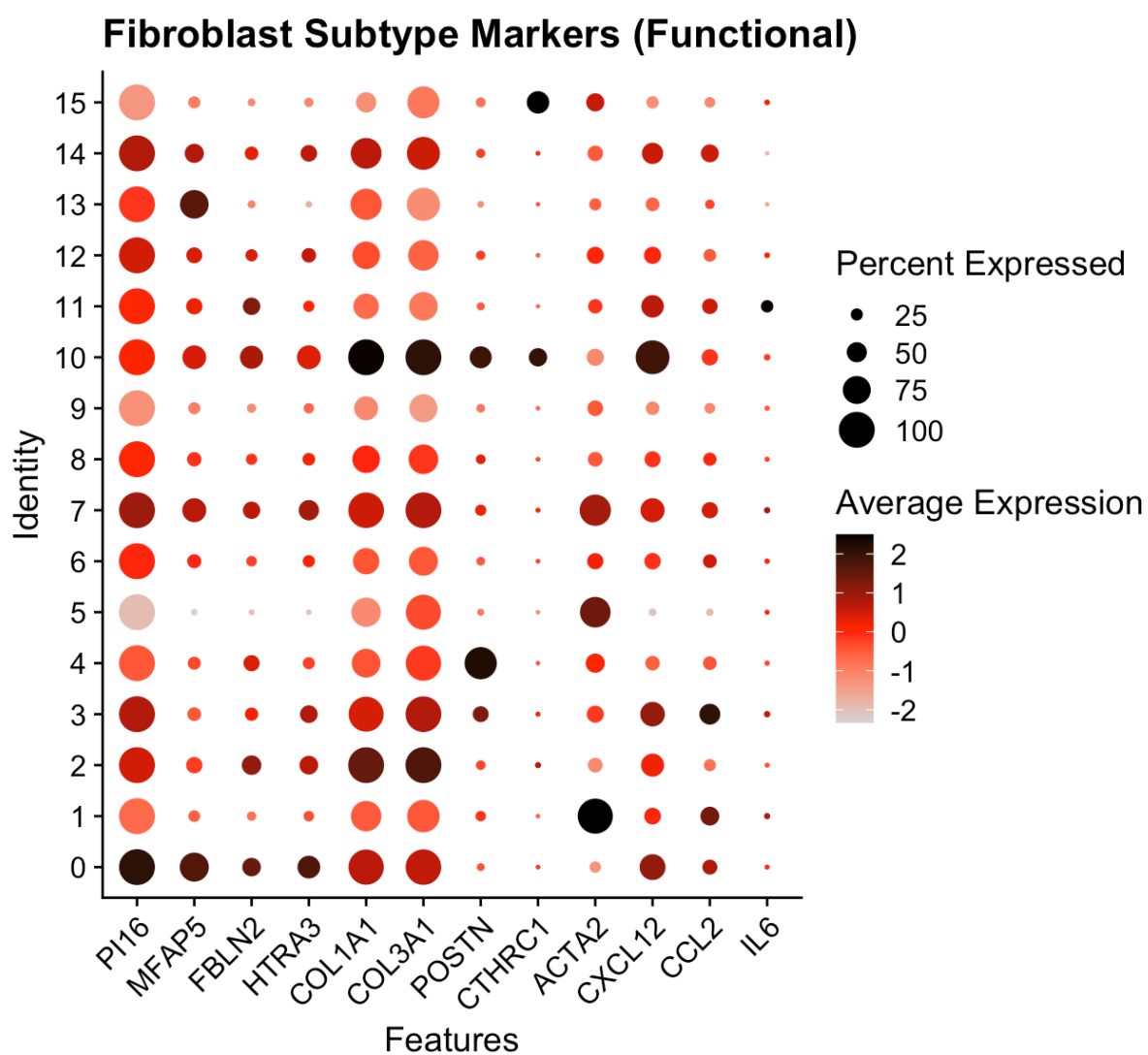


図26 16クラスターにおけるPathogenic Fibroblast マーカーの発現

Sample	Number of fibers (x 10 ⁶ /mg)							Geometric mean		
	Total fibers (x10 ⁶ /mg)	Length category (um)			Diameter category (um)			length (um)	diameter (um)	
		<5	5-20	≥20	<0.1	0.1-0.5	0.5-1.0			≥1.0
Crocidolite	1 414	783 (92%)	66 (7.8%)	2 (0.2%)	344 (40%)	500 (58.8%)	6 (0.7%)	1 (0.1%)	1.34 (1.92)	0.11 (1.63)
Amosite	136	422 (85.8%)	63 (12.8%)	7 (1.4%)	40 (8.1%)	365 (74.2%)	73 (14.8%)	14 (2.8%)	2.05 (2.07)	0.24 (1.81)
									Mean (SD)	Mean (SD)

Values are presented as number of fibers (percentage of total fibers).

SD: Geometric standard deviation.

Total fibers are calculated based on a suspension concentration of 1 mg/ml.

表 1 石綿線維2種の形態計測結果

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7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研究（240202-02）
分担研究項目：正常ブタ肺の1細胞解析結果を用いた、ブタの優位性の概説

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

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、ヒトと臓器・細胞レベルで高度な相同性を有するマイクロミニピッグを用い、石綿関連疾患の次世代型疾患モデルを開発することである。

従来の齧歯類モデルは、ヒトの職業性肺疾患の主座である「広義間質」の未発達や「呼吸細気管支（RB）」を解剖学的に欠損しており、肺胞領域の気腔内における過剰炎症が本質的な間質病態を覆い隠す「生物学的マスク」現象が大きな障壁となっていた。本分担研究報告では、石綿等の吸入性粉塵に起因する職業性肺疾患研究において、マイクロミニピッグが齧歯類（マウス・ラット）に対して有する決定的な優位性について、正常肺の高精度シングルセル解析（TAS-Seq）から得られた知見に基づき概説する。

我々の解析結果は、マイクロミニピッグが以下の3つの階層においてヒトの肺臓器を模倣し、齧歯類モデルにおける制約を克服し、高度な外挿性を提供し得ることを示唆している。

1. 解剖・細胞学的種差の完全な解消:

マウス肺には存在しない粘膜下腺（SMG）ユニットを同定し、ヒト型の高度な液性免疫システム（GAIN）の存在を証明した。また、マウスでは気管等に限定される p63 陽性基底細胞やIonocyte等希少な細胞種が、ブタではヒトと同様に末梢の細気管支領域まで豊富に分布し、再生の幹細胞リザーバーや機能細胞等として存在していることを特定した。さらに、マウス肺には存在しない呼吸細気管支系譜（TRB-SC）や二分能前駆細胞（AT0/RAS）の同定により、ヒト特有の気道・肺胞境界部における初動応答の評価を可能とする細胞種が存在する事がわかった。

2. ヒト型間葉系ニッチと構造構築プログラムの保持:

外膜系譜である PI16 陽性細胞において、マウスでは欠損している MFAP5, FBLN2（弾性線維アセンブリ）や LOX（架橋・硬化）といった、膠原線維・弾性線維を強靱に構築する「ヒト型プログラム」を分子レベルで保持していることを実証した。また、肺胞壁においてもマウス型の「脂質貯蔵型」とは根本的に異なり、ヒトと同様の代謝活性型ニッチ MANC を有しており、線維化の足場形成機序がヒトと類似した間質細胞系譜が保存されていることを示した。

3. 進化的な遺伝子制御（発現スイッチ）の克服:

重要疾患関連遺伝子である HHIP や SERPINA1 が、マウス（間質発現）とは異なり、ブタではヒトと同様に「上皮系」にも集積していることを確認した。これにより、齧歯類モデルで不可避であった細胞間相互作用の解釈における種差と遺伝子発現細胞種の不一致に対してブタでの結果を示した。

結論として、マイクロミニピッグは、齧歯類モデルにおいて不可避であった解剖学的構造（呼吸細気管支や広義間質）、細胞種の多様性、および機能遺伝子の保存性、の全階層にわたる種差を克服し、ヒト肺組織の生理的応答をシングルセル解像度で忠実に再現し得る高度な解析基盤であることを実証した。本知見は、国際的な職業性肺疾患研究において、従来の齧歯類モデルでは到達し得なかったヒト病態への高い外挿性を担保する根拠を提供するものである。本研究の結果、マイクロミニピッグは次世代の疾患モデル構築およびリスク評価において、従来の齧歯類モデルでは到達し得ない高度な優位性を有することが示唆された。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

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。本分担研究報告では、石綿を含む吸入性粉塵に起因する職業性肺疾患に対して、齧歯類と比較してマイクロミニピッグを使用することの意義、特に齧歯類等汎用される実験動物に対する優位性について言論するため、近年の人及びマウスでの肺臓器の1細胞解析で明らかになった知見を参考に、正常マイクロミニピッグの肺臓器における間質細胞、及び上皮細胞の構成・多様性について我々が得ている知見を概説する。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験動物には、ヒトへの外挿性が高く、広義間質の発達が著しいマイクロミニピッグ (MicroMiniPig, 富士マイクラ株式会社, 静岡県, 日本) を用いた。正常肺アトラス構築用に健常個体 (n=3) を使用した。組織採取に際しては、肺の中樞から末梢に至る解剖学的勾配を反映させるため、末梢領域 (胸膜含有: Group A、非含有: Group B) および中枢気道・大血管領域 (Group C) の3部位から厳密なサンプリングを実施した。

2. TAS-Seq 法による高感度シングルセル RNA シークエンシング

摘出した肺組織を、肺解離キット (Multi Tissue Dissociation Kit 1, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用い、37°Cの恒温槽内で機械的・酵素的に消化し、シングルセル懸濁液を調製した。その後、死細胞除去および CD31+/CD45+細胞のソーティング (内皮・免疫系) と CD31-/CD45-細胞 (間葉系・上皮系) を 1:1 でソーティング (FACS Aria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を行い、間葉系細胞を高純度に濃縮した。

細胞捕捉およびライブラリ調製には、BD Rhapsody Express システム (BD Biosciences) を用い、TAS-Seq 法 (Shichino et al., 2021) に従い、逆転写反応および cDNA 増幅を実施した。TAS-Seq 法は従来の全トランスクリプトーム解析と比較し、転写産物の捕捉感度が極めて高く低発現転写因子やシグナル分子の検出に優れている。調整したライブラリは、NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いシークエンシングを行った。

3. データ解析パイプライン

得られた Raw データに対し、Seurat (v4.4.0, R v4.3.2) を用いて解析した。低品質な細胞 (Mito < 5%, nFeature < 200) を除去後、合計 25,305 細胞を統合した。さらに、間葉系細胞の核心部を抽出するため、COL1A1 陽性細胞 (7,643 細胞) 及び EPCAM/CDH1 陽性細胞 (4,568 細胞) に対してサブクラスターリングを実施し、Harmony アルゴリズムによるバッチ補正を経て、13 の独立した間葉系サブセット及び 12 の独立した上皮系サブセット等を同定した。

C. 研究結果

C-0. 正常ブタ肺全細胞景観および系統特定 (図1, 2)

TAS-Seq解析の結果、正常ブタ肺から得られた25,305細胞 (図1B) は、44の独立したクラスターとして分離された。系統マーカーの検討 (図1D, E) により、EPCAM (上皮系)、COL1A1 (間葉系)、CLDN5 (内皮系)、PTPRC (免疫系) の発現を確認し、間葉系細胞及び上皮の境界を特定した。

C-1. 肺間葉系細胞における13サブクラスターの定義 (図2, 3, 4)

本解析では、COL1A1陽性細胞を対象とした高解像度サブクラスター解析により、計7,643個の間葉系細胞を同定した。特筆すべき点として、マウスのシングルセル解析では肺泡領域由来のAlveolar Fibが圧倒的多数を占めることが一般的であるが、本解析の結果では、最多のDuctal MyoF (1,453個) および2位のAdventitial Fib (1,111個) がいずれもAlveolar Fib (805個) を大きく上回る数で同定された。これは、ブタがヒトと同様に極めて発達した広義間質 (大血管や胸膜、気道周囲の鞘状組織) を保持していることを定量的に裏付けていた。また、サンプリング領域 (領域A: 胸膜側、領域B: 実質末梢、領域C: 中枢側) を分けた実験デザインにより、共通の系譜に属しながら局在を異にする解剖学的亜種が明確に分離された。各クラスターの機能的定義および分布特性を以下に記す。

1. Ductal MyoF (1,453個): 肺泡管入口部の括約筋的な構造を支える細胞であり、領域B (実質末梢) において最も優位に認められた。
2. Adventitial Fib (AdvF) (1,111個): 血管および気道の外膜を包む鞘細胞であり、領域AおよびB (末梢側) に広く分布し、弾性線維のアセンブリを担っていた。
3. Bronchial MyoF (960個): 気道平滑筋束に隣接して分布する物理負荷適応型の細胞であり、主に領域Bにおいて同定された。
4. Alveolar Fib (AlvF) (805個): 肺泡壁に常在し上皮支持を担うニッチ細胞 (MANC) であり、領域AおよびBの実質領域に集積していた。
5. Chondrocyte (786個): 肺の骨格を成す軟骨細胞であり、発達した腺組織を伴う領域C (中枢側) にのみ特異的に認められた。
6. Inflam Fib (InflamF) (550個): Adventitial Fibと多くのマーカー (PI16, DPT等) を共有する系譜であるが、領域Cに優位に認められた。UMAP上でもAdventitial Fibと近接しており、中枢側における炎症応答型亜種として定義された。
7. ASM (449個): 気道周囲を螺旋状に取り囲む平滑筋細胞であり、領域AおよびBの気道沿いに分布していた。
8. Axial MyoF (422個): 肺門部の気管支に特異的な筋線維芽細胞であり、免疫制御機能を備え、領域Cに極めて優位に局在した。
9. Pericyte (409個): 毛細血管の内皮を裏打ちする周細胞であり、中枢側の血管系を含む領域Cにおいて高い割合で認められた。
10. Vascular Fib (VascF) (283個): Alveolar Fibと同じ系譜 (NPNT, FGFR4陽性) に属するが、肺泡と小葉間隔壁や細動脈の接触部位という特殊なニッチに局在し、領域AおよびBにおいて同定された。
11. Arterial SMC (229個): 肺動脈中膜を構成する高度な収縮ユニットであり、領域Bを中心に末梢血管系において広く認められた。
12. VSM (104個): 血管壁を構成する平滑筋細胞であり、今回の解析では領域A (胸膜側) において最もdominantに認められた。
13. Schwann cell (82個): 末梢神経を絶縁する神経随伴細胞であり、領域CおよびBの中枢寄り領域に局在していた。

C-2. 外膜系譜 (PI16陽性): 弾性線維形成と免疫制

御ハブの分業 (図4-6)

外膜系譜に属する AdvF と InflammF は、共通して P IL6, LOX, HTRA3, ECM1, C4A, MFAP5 といった強力な遺伝子シグネチャーを共有しており、同一の細胞系統に属する「解剖学的亜種」であることが示唆された。しかし、詳細な発現プロファイルの比較により、両者の間には以下の通り明確な機能的分業が認められた。

AdvFにおいては、弾性線維の主要構成成分である FBLN2 や、組織の機械的特性を維持する ASPN が優位に発現していた。特に MFAP5 と FBLN2 は弾性線維のアセンブリ (組み立て) に必須の糖タンパク質であり、これに加え、組織の硬化 (架橋) を直接担う LOX (Lysyl Oxidase) ファミリーや、細胞外マトリックス (ECM) の品質管理を司る HTRA3 や ASPN が集積していた。これは、AdvF が物理的な「軌」として、大血管や気道の外膜構造を強固に構築・維持する役割に特化していることを裏付けていた。

対照的に、中枢側に優位に局在した InflammFにおいては、ブタにおいて極めて鋭敏な新規指標である CRABP1 (レチノイン酸結合タンパク質) や RARRES1 を獲得していた。機能面では、補体系の活性化因子である CFB, C2, C3, C4A や、免疫細胞の強力な遊走因子である CXCL12, CCL2 を高発現しており、単なる支持細胞を超えた免疫制御ハブとして、初期の炎症応答や免疫細胞の動員を司る特殊な機能を獲得した亜種であることが判明した。

外膜系譜に属する AdvF および InflammF は、先行研究において全身の多様な組織に普遍的に存在し、組織傷害時のリザーバーとして機能する「Universal fibroblast」に相当する遺伝子シグネチャーを提示した。本解析において、AdvF および InflammF はいずれも P IL6, DPT, CD34 を高発現しており、これら幹細胞性に関連する共通マーカーを保持していることが認められた。特に DPT や CD34 は、ヒトの多様な臓器において線維芽細胞の前駆状態を定義する指標として知られており、ブタの肺外膜系譜が「未分化リザーバー細胞」としてのポテンシャルを有していることが分子レベルで裏付けられた。

一方で、マウスの P IL6+ 線維芽細胞において主要な指標とされる IL33, CCL11, ADH7, DPP4 の発現を詳細に検討したところ、本解析のブタ AdvF/InflammF クラスターにおいては、これらの遺伝子は完全に陰性あるいは極めて微弱な発現に留まっていることが判明した (図6B)。マウスを用いた先行研究では、外膜系細胞は IL33 等を介した 2 型免疫応答の指示細胞としての側面が強調されてきたが、ブタにおいてはこれらのマウス型シグネチャーが欠如していた。

この結果は、ブタの肺外膜系譜が、マウス特有の免疫学的プロファイルとは明確に異なり、ヒトの「Universal fibroblast」により近い分子的特徴を保持していることを示唆している。すなわち、サンプリング領域 (領域 A, B, C) を分けることで捉えられた AdvF (末梢側構造維持型) と InflammF (中枢側免疫制御型) の機能分化は、ヒト型 Universal fibroblast が局所のニッチに応じて専門分化した姿であると解釈された。

C-3. 肺胞・血管系譜 (NPNT陽性) : 代謝活性型ニッチと血管走行ガイダンス (図4, 5, 7)

肺胞壁を主座とする Alveolar Fib (AlvF) と、血管随伴性の Vascular_Fib (VascF) は、いずれも IT

GA8, COL13A1, FGFR4, CES1, SOD3, A2M, VEGF を核とした共通の系譜として同定された。これらの共通因子は、肺胞領域における恒常性維持や脂質代謝、酸化ストレス保護という本系統の基盤的機能を象徴していた。

AlvFにおいては、肺胞上皮 (AT2) の接着を直接助ける NPNT (Nephronectin) や、上皮支持シグナルを担う FGFR4、および脂質代謝酵素 CES1 を強力に発現しており、ヒト型 MANC (Mesenchymal Alveolar Niche Cell) の形質を再現していた。さらに本解析では、心肺の発生に関与する GJA5 (Connexin 40) が AlvF 優位に認められた。これは、AT2 と密接に接触し、細胞間コミュニケーションを介して上皮の分化や恒常性を直接支持する機能を裏付けるものである。特筆すべきは、マウスで顕著な脂質貯蔵型 (Lipofibroblast) の指標である PLIN2, PPARG, LRAT, RBP1 がブタでは完全に陰性であった点である。

しかし、脂質輸送を担う APOE, LPL, FABP4 の発現は認められ、ブタはヒトと同様に「貯蔵」ではなく「能動的な代謝・輸送」によって肺胞環境を制御する代謝活性型ニッチを有していることが判明した。

一方で、血管や隔壁境界部に局在する VascF においては、細胞骨格制御に関わる DOCK4 や、微小管モータータンパク質 KIF26B、マトリックス修飾酵素 UST、さらに血管走行の誘導に関わる受容体 GRID2, PTPRD、および ECM 微細調節因子である ADAMTSL1, ADAMTS17 の特異的な集積が認められた。これは、肺胞壁から血管走行路へと移行する微細な解剖学的境界において、血管ネットワークの構築や維持を物理的・分子的にガイドする専門的な役割を担っていることを示唆している。

C-4. 筋線維芽細胞系譜: 物理負荷適応とニッチ形成 (図4, 5)

Myofibroblast (MyoF) 系譜として同定された Ductal_MyoF と Bronchial_MyoF は、共通して WIF1, GREM1, CLDN11, WNT11, FGF18 といったシグナル調節因子を発現していた。両者は共に ACTA2, TAGLN, MYH11 といった収縮関連マーカーを豊富に保持する一方で、中間径フィラメントである DES (Desmin) が陰性であるという、成熟平滑筋細胞とは一線を画す「生理的筋線維芽細胞」としての共通シグネチャーを提示した。

Ductal_MyoF (肺胞管入口部の括約筋) においては、Hedgehogシグナルの抑制因子 HHIP や Wnt拮抗因子 WIF1 を高発現していた。これらは気道と肺胞の接続部において、幹細胞ニッチの恒常性を保つニッチとして機能していることが推測された。対照的に、気道周囲に局在する Bronchial_MyoF においては、PDZRN4, KCNQ5, TRPC4 の特異的な発現が新規に同定された。これらの遺伝子群は機械刺激受容やカルシウムチャネル制御に関与しており、気道の収縮・拡張に伴う物理的な負荷に動的に適応するための専門的なプログラムを保持していることが示された。

C-5. 軸位間質系譜: 中枢気道領域の免疫制御ハブ (図4, 5)

Axial_MyoF (軸位間質線維芽細胞) は、主に領域 C (中枢気道・大血管領域) に極めて特異的に局在するクラスターとして同定された。本細胞は血管平滑筋細胞 (VSM) や周細胞 (Pericyte) と共通のシグネチャー (NOTCH3, DES 等) を呈する一方で、免

疫細胞の動員を司るケモカイン CCL19, CCL2 を極めて強力に産生している点が最大の特徴である。

解剖学的に中枢側の太い気管支を包む軸位間質に位置する本細胞は、石綿等の有害物質吸入時に、リンパ系へと続く道筋でマクロファージやリンパ球を動員する免疫制御ハブとしての役割を担っていると推測される。これはヒトの太い気道で見ついている IR-fibro と相同な細胞であり、中枢側における初動の免疫応答を統御する重要なニッチとして機能している。

C-6. 肺上皮細胞における12サブクラスターの定義 (図8, 9)

TAS-Seq解析により、計4,568個の上皮系細胞から12のクラスターを同定した。本解析の結果、マイクロミニピッグの肺上皮は、解剖学的にマウスでは欠損している呼吸細気管支 (TRB-SC) や移行帯前駆細胞 (AT0/RAS)、および粘膜下腺 (SMG構成細胞) を分子レベルで完全に再現しており、正常マウス肺内では同定が困難な基底細胞 (Basal)、Tuft1/2, Ionocyteなども明確に同定できており、齧歯類と比較しヒト病態研究における極めて優れた研究基盤であることが明らかとなった。各クラスターの定義と局在特性を以下に記す。

1. Basal (1,157個)：上皮の恒常性維持と再生を担う幹細胞であり、全上皮の約25%を占める最多クラスターとして、特に領域B (末梢気道) で高頻度に認められた。
2. AT2 (699個)：サーファクタント産生を担うII型肺胞上皮細胞であり、実質末梢である領域AおよびBにのみ特異的に認められた。
3. AT0/RAS (Transitional TRB-SC-AT2) (625個)：気道と肺胞の境界 (移行帯) に局在するヒト・ブタ特有の二分能前駆細胞であり、領域BおよびAの移行部に集積していた。
4. SMG Serous (481個)：強力な液性免疫タンパク質を分泌する腺漿液ユニットであり、中枢側の領域Cにdominantに認められた。
5. Club (343個)：防御と代謝を担う分泌細胞であり、中枢側の気道が豊富な領域Cに極めて優位に分布した。
6. TRB-SC (296個)：呼吸細気管支 (RB) 領域を構成するヒト型気道分泌細胞であり、領域BおよびAの末梢気道領域に優位に認められ、RB領域の構造基盤を形成していた。
7. Tuft-2 (Immune) (293個)：免疫細胞の性質を模倣 (Mimicry) する免疫応答型タフト細胞であり、領域Bを中心に局在が認められた。
8. AT1 (241個)：ガス交換を担う扁平なI型肺胞上皮細胞であり、AT2と同様に領域AおよびBの実質末梢にのみ特異的に認められた。
9. Tuft-1 (Sensory) (148個)：外界の化学刺激を受容する感覚型タフト細胞であり、Tuft-2と同様に領域Bを中心に分布していた。
10. SMG MyoE (123個)：粘膜下腺の周囲を包み、腺液排出を駆動する筋上皮細胞であり、中枢側の領域Cに特異的に認められた。
11. Ionocyte (95個)：気道におけるイオン輸送の中核を担う希少細胞であり、今回の解析では領域B (末梢気道) において最も多く認められた。
12. Ciliated (67個)：気道浄化を担う線毛細胞であり、サンプリングされた気道全域 (領域Bおよび

A) に広く分布していた。

以後、TAS-Seq解析により同定された12の上皮サブクラスターについて、既知マーカーによる相同性検証およびブタ独自に見出した新規マーカーに基づき、その詳細な分子的特徴を記す。

C-7. 希少細胞における高度な分化とサブタイプ分離 (図10-12)

希少細胞クラスターにおいては、TAS-Seqの高感度な捕捉能により、既存のヒトマーカーに加え、ブタで極めて鋭敏に発現する新規指標が多数同定された。

アイオノサイト (Ionocyte) においては、ヒトで既知の転写因子である FOXI1 やプロトン輸送体 ATP6V1G3 の発現 (図11) に加え、ブタにおいて極めて特異性の高い新規指標 STAP1、および新規の膜タンパク質 TMEM61、タイトジャンクション構成因子 CLDN25 が同定された (図12)。これにより、ブタのアイオノサイトが強固なバリア機能と独自の細胞内シグナル伝達系を備え、気道表面液の恒常性を精密に制御していることが示唆された。

タフト細胞 (Tuft cell) については、ヒトでも報告されている共通マーカーである POU2F3 および TRPM5 が、今回の解析で同定された両タフトクラスターにおいて特異的かつ安定して発現していることが確認された (図11)。その上で、これらタフト細胞は感覚型 (Tuft-1) と免疫応答型 (Tuft-2) の2つのサブタイプに明確に分離された。

感覚型の Tuft-1 においては、化学受容関連因子である PIK3R5, L1CAM, RGS21 を発現しつつ、神経回路形成に関わる DSCAML1 を Top 1 遺伝子として保持していた。さらに KCNB2, KCND3 といった電位依存性チャネルや小胞タンパク質 SV2C、増幅因子 PRKG1 が認められ (図12)、外界の化学刺激を電気信号として神経系へ出力する感覚ユニットとしての専門性が実証された。

対照的に免疫応答型の Tuft-2 においては、ロイコトリエン合成酵素である ALOX5, ALOX5AP, LTC4S に加え、ヒトの特定サブセットでも報告がある POU2AF2 や IL17RB の発現が認められた (図11)。特筆すべきは、B細胞系因子である SPIB, CD79B や、マイエロイド系シグナル分子 HCK, RAC2、さらに周囲の細胞を動員する成長因子 PTN の特異的な集積が認められた点である (図12)。これは、ブタの Tuft-2 が上皮細胞でありながら免疫細胞の挙動を模倣 (Mimicry) し、局所の免疫ニッチを組織化する専門的な機能を獲得していることを示していた。

C-8. 気道および粘膜下腺の機能的深化 (図10-12)

粘膜下腺 (SMG) および主要な気道構成細胞についても、解剖学的局在と密接に連動した機能遺伝子の集積が確認された。

腺筋上皮細胞 (SMG MyoE) においては、基底細胞と同様にKRT17, KRT5, TP63の特異的な発現を示しながら、基底細胞と差別化されるマーカーとして、共通の収縮装置である ACTA2, TAGLNに加え、今回のブタ解析における Top 1 指標として PCP4 が同定された (図12)。また、成熟した収縮装置を構成する MYH11 の強力な発現や CNN1, MYLK といった高度な収縮調節因子、さらに中間径フィラメントである DESの欠損が認められた。加えて、解毒酵素 CBR1やヒトとの共通の種間発現スイッチ遺伝

子である SERPINA1、接着因子の LAMA1が集積していたことは、本細胞が腺液排出を物理的に駆動する生理的ユニットとして高度に専門化していることを裏付けていた。

腺漿液・導管ユニット (SMG_Serous / Duct) においては、強力な抗菌タンパク質 LTFの発現を確認した。さらに、ブタ独自の極めて鋭敏な指標 PHEROCや分泌因子 SCGB1D1を新規同定したほか、ヒトの空間オミクス解析で導管指標とされる ALDH1A3, KR T23、および免疫ニッチ形成に必須のケモカイン CC L28の発現が認められた (図12)。これにより、本クラスターがマウスには存在しない、ヒト型の高度な液性免疫システム GAINおよび腺組織の導管ネットワークを網羅的に保持していることが証明された。

基底細胞 (Basal) においては、幹細胞指標である TP63, KRT5, KRT17に加え (図11)、高い再生ポテンシャルを示す KRT15や、細胞接着・増殖制御を担う GPC3, DLK2, COMPが同定された (図12)。これにより、上皮の足場形成能と恒常性維持機能が分子レベルで裏付けられた。

クラブ細胞 (Club) においては、解毒酵素 CYP2F1, CYP2A19や、高度な抗菌保護を担う GSTA1, S100A12の集積を認め (図12)、ヒト型分泌細胞の代謝活性が完全に再現された。

C-9. 遠位気道から肺胞へのヒト型移行系譜 (図10, 11, 13)

本解析の最大の成果として、マウスには解剖学的に存在しない呼吸細気管支 (RB) から肺胞に至る、ヒト特有の段階的な移行系譜が鮮明に同定された。

まず、呼吸細気管支分泌細胞 (TRB-SC)、二分能肺胞前駆細胞 (AT0/RAS)、およびII型肺胞上皮細胞 (AT2) に共通する系譜マーカーとして、VEPH1がブタ肺において新規に同定された (図13B)。VEPH1は細胞の極性制御やシグナル伝達に関与する因子であり、遠位気道から肺胞へと連続する本系譜のアイデンティティを定義する重要な指標であることが示唆された。

各ステージにおける分子的特徴を詳細に検討した結果、以下の通り機能的な専門化が認められた。

呼吸細気管支分泌細胞 (TRB-SC) においては、DAPK1, MAPK10, ASTN2, HUNKといったストレス応答や細胞生存に関わるキナーゼ群に加え、RB領域の物理的な足場を形成する構造コラーゲン COL23A1や細胞骨格制御因子 NCKAP5、さらに前駆細胞の移動や極性を司る ELMO1, PREX2が特異的に同定された (図13B)。これらの遺伝子群の集積は、RB領域が単なる気道の延長ではなく、環境刺激に対して動的に応答しつつ構造を維持する、高度な末梢気道ニッチとして機能していることを裏付けていた。

二分能肺胞前駆細胞 (AT0/RAS) においては、SCGB3A2と SFTPCを共発現し、AT1およびAT2両系統への分化ポテンシャルを保持するプロファイルが確認された。特筆すべきは、UMAP空間上における本クラスター内の分子的極性である (図8A, 13A)。クラスター上部の領域では SCGB1A1, SCGB3A1, SCGB3A2といった分泌指標が優位であるのに対し、下部領域に向かうにつれてこれらが減弱し、代わって SFTPC, SFTPB, SFTPA1, SFTPDといった肺胞指標が支配的になるという、連続的な発現勾配が認められた。これは、AT0/RASクラスターが「気道型」から「肺胞型」へと分化が進行する過渡期の細胞を解像度高く内包していることを示しており、ヒト肺で提

唱されている二分能前駆細胞のダイナミズムをブタにおいて可視化した重要なデータと言える。

さらに本クラスターでは、ケモカイン CXCL12、水チャネル AQP4、代謝関連の UGT2B31、抗炎症因子 AMBP、細胞外マトリックス構成因子の FBN3、バリア形成を担う CLDN10、炎症応答の CXCL8、分化制御因子 BMP3 が特異的に検出された (図13B)。これは、前駆細胞が肺胞へと分化する過程で、生体異物代謝や肺胞保護機能をあらかじめ獲得する準備状態にあることを示していた。

肺胞領域の中心的な細胞種であるII型肺胞上皮細胞 (AT2) では、サーファクタント産生に関連する SFTPCを核とし、脂質輸送体 FABP3や生体防御因子 CHIA, C5, CSF2が集積し、代謝・防御機能が完成されていた。特筆すべきは、図11に示された通り、リゾリン脂質合成酵素である LPCAT1や、AT2特異的な細胞内オルガネラであるラメラボディの形成・維持に不可欠な輸送体 ABCA3の強力な発現が認められた点である。これにより、ブタのAT2が肺サーファクタントの合成から貯蔵、放出に至る一連の高度な専門機能を分子レベルで保持していることが証明された。

さらに、疾患関連遺伝子である HHIPの発現パターンを検討した。HHIPはヒトでは AT2 マーカーであるが、マウスではAT2を含む上皮での発現が失われて間質系にスイッチすることが知られている。本解析の結果、ブタのHHIPはAT2に加え、特定の線維芽細胞クラスター (Adventitial_Fib等) でも発現が認められた (図4, 13B)。このことは、ブタにおけるHHIPがヒト型 (上皮系) とマウス型 (間質系) の両方の性質を兼ね備えた中間的な調節役割を担っている可能性を示唆しており、種間発現スイッチの進化プロセスを理解する上でも極めて興味深いデータとなった。

最後に、考察での議論を支える基盤データとして、セクレトグロビン (SCGB) ファミリーおよびサーファクタント (SFTP) ファミリーの網羅的解析を実施した (図13A, B)。SCGB1A1およびSCGB3A1は中枢側のClub細胞やSMG領域に強く認められたのに対し、SCGB3A2はAT0/RASにおいて極めて強い発現を示し、遠位気道のアイデンティティを象徴していた。SFTPファミリーについては、SFTPB, SFTPA1, SFTPDがTRB-SCからAT2にかけて段階的に上昇する一方で、SFTPCはAT0/RASおよびAT2に厳密に限定されており、これら分子のプロファイルは、ブタ肺がヒト肺と同様の精緻な気道-肺胞グラジエントを保持していることを視覚的にも証明していた。

D. 考察

本研究における先進的ゲノム解析を駆使した「高精度ブタ肺細胞アトラス」の構築は、既存の齧歯類 (マウス・ラット) モデルが抱えていたヒト疾患への外挿性という限界を突破し、職業性肺疾患の病態解明に新たなパラダイムをもたらすものである。本研究結果が有する学術的・医学的意義を以下の7点から考察する。

1. 職業性肺疾患研究におけるブタ肺の解剖学的・分子的妥当性

石綿肺、珪肺、炭鉱夫肺などのじん肺をはじめとする職業性肺疾患の多くは、単なる肺胞領域の病変

ではなく、吸入された粒子を貪食したマクロファージが、軸位間質、小葉間隔壁、および胸膜下間質を含む広義間質に沈着・停滞することを起点とした炎症性線維性疾患軸として理解されている。しかし、これまで標準的な疾患モデル動物として多用されてきたマウスやラット等の齧歯類の肺では、広義間質の発達がヒトに比べて極めて未熟であり、弾性線維や膠原線維による強靱な構造構築能力が不十分であることが知られている。Umeda ら (2025) が哺乳類 30 種類以上を種横断的に比較した結果によれば、肺胞領域が高度に類似・保存されていることとは異なり、齧歯類はヒトの職業性肺疾患の主座となる広義間質（小葉間隔壁が欠如し、軸位間質や胸膜下間質が脆弱化している等）や呼吸細気管支（RB）といった構造が人や大動物と比べて未熟であった。Travaglini ら (2020) および Sikkema ら (2023) が示す通り、マウスはヒト肺の細胞型の約 29% を欠損しており、対応する細胞間でも数百の遺伝子発現の乖離が認められる。この構造の未発達及び 1 細胞レベルによる遺伝子シグネチャーの種差により、特にラットでは肺胞領域における過剰な炎症

（Airspace-Dominant Phenotype）が生じ、これがヒト病態の本質である広義間質病変を物理的に覆い隠してしまう「Biological Mask（生物学的マスク）」現象を引き起こすことが、人への外挿性を低下させると Yamano ら (2026) により指摘されている。

Shichino ら (2021) が開発した TAS-Seq 法により得られた高感度な分子プロファイルは、この解剖学的なブタ肺の優位性を裏付ける決定的なエビデンスを提示した。広義間質の強靱な構造を構築・維持する中心的な細胞種として特定された PI16 陽性

「Universal fibroblast」（McCartney et al., 2024）である AdvF および InflamF において、弾性線維の主要構成成分である FBLN2 や、組織の機械的特性を維持する ASPN が優位に発現していることが認められた。特に、弾性線維のアセンブリに必須の糖タンパク質である MFAP5 と FBLN2 に加え、組織の硬化（架橋）を直接担う LOX ファミリー、さらにはマトリックスの品質管理を司る HTRA3, ECM1, ASPN の集積が確認された。

興味深いことに、Travaglini ら (2020) や Tsukui ら (2020, 2025) の報告により、マウスの線維芽細胞ではこれら膠原線維や弾性線維の組み立て、および架橋に関連する一連の機能遺伝子群が失われていることが明らかとなっていた。マウスの PI16 陽性細胞では欠損していたこの高度な組織化ポテンシャルを、ブタはヒトと同様に分子レベルで保持しており、これが物理的な広義間質の形成と高度に符合していた。このことは、Tsukui ら (2024) が指摘するような、線維化病態において鍵となる間葉系ニッチの動態を、ブタであればヒトと同じ機能ユニットで解析可能であることを示している。

さらに、この強靱な軸位間質の入り口となる呼吸細気管支（RB）領域においても、マウスには存在しないヒト特有の上皮系譜である TRB-SC や AT0/RAS (Basil et al., 2022; Kadur Lakshminarasimha Murthy et al., 2022) がブタでも同定され、それらが構造コラーゲンである COL23A1 等を介して独自のニッチを形成していることが判明した。我々は既に p63 陽性基底細胞がブタ肺の呼吸細気管支にまで存在することを確認しており、これらの細胞種が末梢気道に存在する事実は、吸入物質の曝露が最初に引き起こす呼吸細気管支から広義間質への病変進展というヒト特有の病態を、ブタモデルであれば解剖学的構造と分子メカニズムの両階層において極めて忠実に再現・評価できることを示唆している。

結論として、本解析で同定されたブタ肺におけるヒト型細胞群は、齧歯類モデルにおける種差を埋めるものである。これは Zhu ら (2025) が大規模なヒト統合アトラスで定義した汎組織的な線維芽細胞の不均一性と高度に整合する、ヒト型分子シグネチャーに基づく 1 細胞解像度で再現可能な優れた解析基盤であると考えられる。

2. 正常マウス肺における種差：ヒト型希少細胞および分泌ユニットの保存

本研究における正常ブタ肺アトラスの構築は、齧歯類モデルでは到達不可能な、正常肺内におけるヒト型希少細胞を捉えることに成功している。

Plasschaert ら (2018) や Montoro ら (2018) によって同定されたアイオノサイト（Ionocyte）は、マウスにおいては気管（Trachea）には存在するものの、肺内部（気管支・細気管支）にはほとんど存在しないことが知られている。しかし、Shah ら (2025) の最新の解析によれば、ヒトではアイオノサイトは中枢側の大気道のみならず、末梢の細気管支（Small airways）においても一定の割合で定常的に存在していることが証明された。本解析において、ブタの末梢気道（領域 B）から明確なアイオノサイト・クラスターが同定された事実は、このヒト特有の分布パターンを分子レベルで完全に再現していることを意味する。ブタのアイオノサイトでは、ヒト共通指標に加え、新規指標 STAP1 や強固なバリア形成を担う CLDN25 が同定されており、末梢気道における環境維持機能が裏付けられた。

タフト細胞（Tuft cell）についても、種間での決定的な乖離が報告されている。マウスの肺におけるタフト細胞は、正常時にはほぼ存在せず、重篤な傷害後に初めて「異所的」に出現する傷害誘導性細胞（Injury-induced tuft cells）であることが Barr ら (2022) によって報告されている。これに対し、ヒトの肺では Shah ら (2025) が示した通り、正常時から末梢に至る全域にタフト・アイオノサイト前駆細胞（TIP 細胞）や成熟タフト細胞が広く分布し、生体防御のセンサーとして機能している。ブタ肺に

において、正常な状態から感覚型 (Tuft-1) と免疫応答型 (Tuft-2) のサブタイプが同定されたことは、粉塵等の吸入粒子に対する「定常時からの初動応答」を、マウスでは不可能な解像度で評価できる可能性を示唆している。

さらに、再生の要となる基底細胞 (Basal cell) の分布も重要な種差である。マウスの基底細胞は気管および太い気管支に限定されているが、ヒトおよびブタでは末梢の細気管支領域まで広く分布している。本解析で、全上皮の約 25% を占める基底細胞が末梢気道 (領域 B) においても高頻度に認められ、p63 陽性細胞として組織学的にも確認された事実は、末梢気道における不全再生や化生病変の解析においてブタモデルが不可欠であることを示している。近年、ヒトの肺線維症 (IPF) 病態において、末梢領域における基底細胞の「異常な動態」が疾患の本質であるとする報告が相次いでいる。Adams ら (2020) は、IPF 肺の線維化病巣 (myofibroblast foci) の最前線に、基底細胞マーカー (TP63, KRT17 等) と間葉系指標、さらには老化マーカーを同時に発現する「aberrant basaloid cells (異常基底様細胞)」が異所的に出現することを同定した。また、Kathiriyar ら (2021) は、マウスの II 型肺胞上皮細胞 (AEC2) とは異なり、ヒトの AEC2 は線維化シグナルに応答してこれらの「異常な基底細胞」へと直接分化転換 (transdifferentiate) する独自の可塑性を有することを実証した。これらの知見を鑑みると、正常時から末梢気道全域に豊富な基底細胞のリザーバーを保持しているブタ肺は、ヒト特有の異常な上皮再構築や分化転換プロセスを、齧歯類では不可能な解像度で追跡・検証できる優れた解析プラットフォームであると言える。

間葉系においても、マウスには肺内に存在しない粘膜下腺 (SMG) ユニットや、軸位間質を主座とする Axial_MyoF (軸位間質線維芽細胞) がブタで特定された意義は極めて大きい。Axial_MyoF は CCL19 や CCL2 を強力に発現する「免疫制御ハブ」としてのプロファイルを持ち、ヒト肺アトラス (Madisson et al., 2022/2023) で定義された IR-fibro と高度に相同であった。マウス肺の間葉系アトラス (Tsukui et al., 2020, 2025) においては、このような肺常在性の CCL19 陽性・Pericyte 様筋線維芽細胞は同定されておらず、二次リンパ器官に限定された機能であると考えられてきた。

加えて、ブタの SMG クラスタにおいて、ヒトの気道防御の中核として提唱された GAIN (Gland-associated immune niche) が同定された点の特筆に値する。GAIN は、Madisson ら

(2022/2023) が発見した概念であり、腺上皮細胞が CCL28 や APRIL, IL6 などの因子を介して IgA プラズマ細胞の集積と生存を制御する「局所的な制御区」として機能する。マウスでは解剖学的に肺内の SMG を欠くため、この GAIN を介した高度な

液性免疫システム自体が肺内には存在しない。したがって、ブタモデルにおいて Axial_MyoF による間質内での免疫動員と、GAIN による腺組織内での局所免疫制御の両面が確認されたことは、石綿等の吸入物質に対する「ヒト型」の初動応答を解明する上で、これ以上ない強力な解析基盤であることを実証している。

加えて、TAS-Seq の高感度な捕捉能とブタ肺の解剖学的完全性により、神経随伴細胞

(Schwann cell) や軟骨細胞 (Chondrocyte) といった希少な間質系譜までを網羅的に捉えることができた。これら「マウスには存在しないヒト型細胞群」を網羅した本アトラスは、クリアランス不全による粘液塞栓や、初期の間質内免疫制御といった、ヒト職業性肺疾患の種差を埋める優れた解析基盤であると言える。

3. ヒト型肺胞ニッチと再生プログラムの保存：マウス型「脂質貯蔵」からヒト型「代謝活性」への転換

本解析が提示した肺胞領域における興味深い知見の 1 つは、肺胞壁における間葉系ニッチの分子的特異性が、マウスとは根本的に異なり、ヒトと高度に相同であるという点である。齧歯類モデルでは、肺胞上皮 (AT2) を支持する中心的な細胞種は脂質貯蔵に特化した脂質貯蔵型線維芽細胞 (Lipofibroblast) であるとされ、その指標として PLIN2 や PPARG が確立されている。しかし、最新のヒト肺統合アトラス (HLCA) によれば、ヒト肺においてはこのマウス型細胞の存在は否定されており、代わりに代謝活性が高い MANC

(Mesenchymal Alveolar Niche Cell) が上皮支持の要であることが示されている。

本研究におけるブタの AlvF は、上皮支持因子である NPNT や FGFR4、さらに脂質代謝酵素 CES1 を強力に発現しており、Zepp ら (2017) が定義したヒト型 MANC の形質を分子レベルで再現していた。特筆すべきは、マウスの Lipofibroblast の絶対的指標である PLIN2 や PPARG がブタでは完全に陰性であった点である。これは、ブタがヒトと同様に、単なる脂質の「貯蔵」ではなく、能動的な「代謝・輸送」を介して肺胞環境を動的に制御する代謝活性型ニッチを有していることを実証している。

また、損傷後の再生ダイナミズムにおいても、ブタはヒト特有のルートを保持していることが判明した。本解析で同定された AT0/RAS クラスタは、UMAP 空間上において、上部の気道分泌型 (SCGB 系) から下部の肺胞型 (SFTP 系) へと連続的に発現が移行する分子的極性を鮮明に描き出していた。これは、Basil ら (2022) の RAS 細胞 (気道側前駆細胞) と、Kadur Lakshminarasimha Murthy ら

(2022) の AT0 細胞 (肺胞側移行状態) というヒト特有の 2 つの状態が、ブタ肺においては同一クラ

スター内での連続的な分化プロセスとして高解像度に統合されていることを意味する。

特に SFTPB の挙動は興味深く、他のサーファクタント (SFTPC, SFTPA1 等) が AT2 を頂点として気道側へ向かって減弱するのに対し、SFTPB は TRB-SC において既に AT0/RAS よりも高い発現レベルに達していた。これは、Kadur Lakshminarasimha Murthy ら (2022) がヒトの遠位気道を SFTPB の発現によって定義した知見と高度に一致しており、ブタの呼吸細気管支系譜が、単なる通過点ではなく独自の分泌機能を備えた完成されたニッチであることを裏付けている。石綿曝露による損傷時、どの細胞がどう動員されるかという「ヒト型の再生ルート」を、ブタであれば分子的極性の変化としてリアルタイムに追跡できる優れたモデルであると言える。

さらに、本研究はヒトとマウスの間で認められる進化的な「発現スイッチ (Type 3 switch)」現象の克服にも成功した。例えば、肺疾患との関連が深い重要遺伝子 HHIP や SERPINA1 は、ヒトでは上皮細胞で発現するが、マウスでは間葉系細胞で発現するという決定的な種差がある。本解析の結果、ブタにおいてこれらはヒトと同様に上皮系 (AT2 等) での集積が確認され、分子レベルの制御機構がヒトと高度に保存されていることが判明した。マウスモデルでは、これら因子の「ソース (出どころ)」が異なるために上皮-間質相互作用の解釈を誤るリスクがあるが、ブタはヒトと同じ細胞ソースから疾患シグナルを発信するため、創薬ターゲットの選定やリスク評価において極めて高い信頼性を提供する。

E. 結論

本分担研究で概説したマイクロミニピッグの正常肺における高精度な 1 細胞アトラス結果と、近年のヒト及びマウスを用いた 1 細胞解析結果の包括的な比較は、人の肺を構成する細胞の多様性とマウスの限界を明らかにすると共に、ブタの優位性を示した。本解析により、マイクロミニピッグの肺は、解剖学的構造 (呼吸細気管支や広義間質)、細胞種の多様性、および機能遺伝子の保存性という全ての階層においてヒト肺に極めて類似していることが概説された。特に、齧歯類では欠損している呼吸細気管支系譜 (TRB-SC, AT0/RAS に加え、末梢基底細胞) や粘膜下腺ユニット、さらにはヒト型の間葉系ニッチ (PI16 陽性細胞や Axial_MyoF) が分子レベルで特定されたことは、石綿等の吸入粉塵に対するヒト特有の初動応答を評価する上で決定的な優位性となる事が期待される。

マイクロミニピッグを含むブタは、石綿曝露等の物理的粉塵刺激に対する「ヒト組織の実際の応答」を 1 細胞解像度で解明するためのヒト病態への高い外挿性を担保するリファレンスとなり得る優れた動物である。これらの種と先進的なシングルセルゲノ

ミクスを駆使することで、齧歯類モデルとヒト病態の間に存在する解剖学的・分子的差異を同定・解消し、次世代の職業性肺疾患研究およびリスク評価を牽引する強力なデータを創出することが期待される。

F. 引用文献

1. Yamano, S., Schaudien, D., Umeda, Y., et al. (2026). The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles. *Nanomaterials* 16, 230.
2. Zhu, X., et al. (2025). A systematic characterization of fibroblast subtypes and heterogeneity. *iScience* 28, 113915.
3. Shah, V. S., et al. (2025). Single cell profiling of human airway identifies tuft-ionocyte progenitor cells displaying cytokine-dependent differentiation bias in vitro. *Nat. Commun.* 16: 60441.
4. Umeda, Y., Izawa, T., Yamano, S., et al. (2025). Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J. Toxicol. Pathol.* 38: 113–129.
5. Liu, K., et al. (2025). Fibroblast atlas: Shared and specific cell types across tissues. *Sci. Adv.* 11: eado0173.
6. Tsukui, T., et al. (2025). Stromal heterogeneity in the adult lung delineated by single-cell genomics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 328: C1964–C1972.
7. McCartney, E. E., et al. (2024). Life of Pi: Exploring functions of PI16+ fibroblasts. *F1000Research* 13: 126.
8. Tsukui, T., et al. (2024). A fibroblast-rich niche identifies a pathogenic subset of myofibroblasts in fibrosis. *Nature* 630: 172–180.
9. Sikkema, L., et al. (2023). An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat. Med.* 29: 1563–1577.
10. Madissoon, E., et al. (2022/2023). A spatially resolved atlas of the human lung characterises a gland-associated immune niche. *Nat. Genet.* 54: 1714–1725.
11. Basil, M. C., et al. (2022). Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature* 604: 120–126.
12. Kadur Lakshminarasimha Murthy, P., et al. (2022). Human distal lung maps and lineage hierarchies reveal a bipotent progenitor. *Nature* 604: 111–119.
13. Barr, J., et al. (2022). Injury-induced pulmonary tuft cells are heterogenous, arise independent of key Type 2 cytokines, and are dispensable for dysplastic repair. *eLife* 11: e78074.
14. Shichino, S., et al. (2021). TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for single-cell RNA sequencing. *Commun. Biol.* 4: 156.
15. Kathiriyai, J. J., Wang, C., Zhou, M., et al. (2021). Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells. *Nat. Cell Biol.* 23, 10–23.

16. Travaglini, K. J., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587: 619–625.
17. Tsukui, T., et al. (2020). Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat. Commun.* 11, 1920.
18. Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S., et al. (2020). Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* 6, eaba1983.
19. Plasschaert, L. W., et al. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560: 377–381.
20. Montoro, D. T., et al. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560: 319–324.
21. Zepp, J. A., et al. (2017). Distinct Mesenchymal Lineages and Niches Promote Epithelial Self-Renewal and Myofibrogenesis in the Lung. *Cell* 170: 1134–1148.

G. 研究発表

3. 論文発表

- 43) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026 Feb 16(4):230. <https://doi.org/10.3390/nano16040230>
- 44) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep.* 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 45) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen.* 2025 Oct 30;45(1):33. doi: 10.1186/s41232-025-00396-z.
- 46) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol.* 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.
- 47) 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. 学会発表

- 32) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 - 第 16 回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-第 17 回大気バイオエアロゾルシンポジウム 2026 年 2 月
- 33) 梅田ゆみ, 山野荘太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変 第 73 回日本職業災害・医学会学術大会 2025 年 11 月
- 34) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生 日本産業衛生学会 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2025 年 10 月
- 35) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出 フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー 2025 年 9 月
- 36) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは? 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025 年度 若手支援技術講習会 2025 年 9 月
- 37) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kamiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025) 2025 Sep
- 38) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による 職業性肺疾患研究の新展開 第 13 回 日本繊維状物質研究学術集会 2025 年 8 月 招待有り
- 39) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変 第 42 回 エアロゾル科学・技術研究討論会 2025 年 8 月
- 40) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出 第 38 回発癌病理研究会 2025 年 8 月
- 41) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する 第 98 回 日本産業衛生学会 2025 年 5 月

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

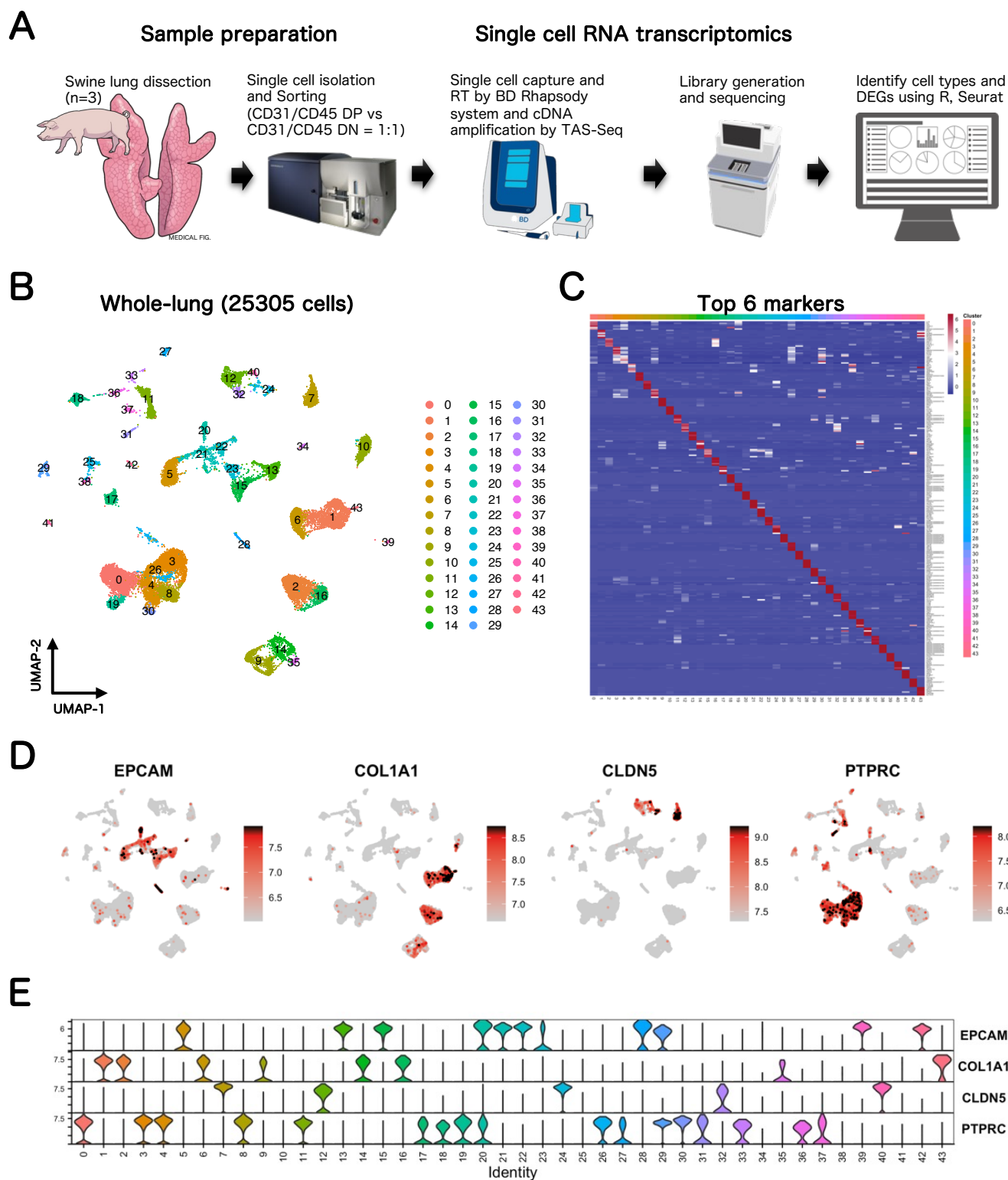


図1 正常マイクロミニピッグ肺の1細胞解析概要

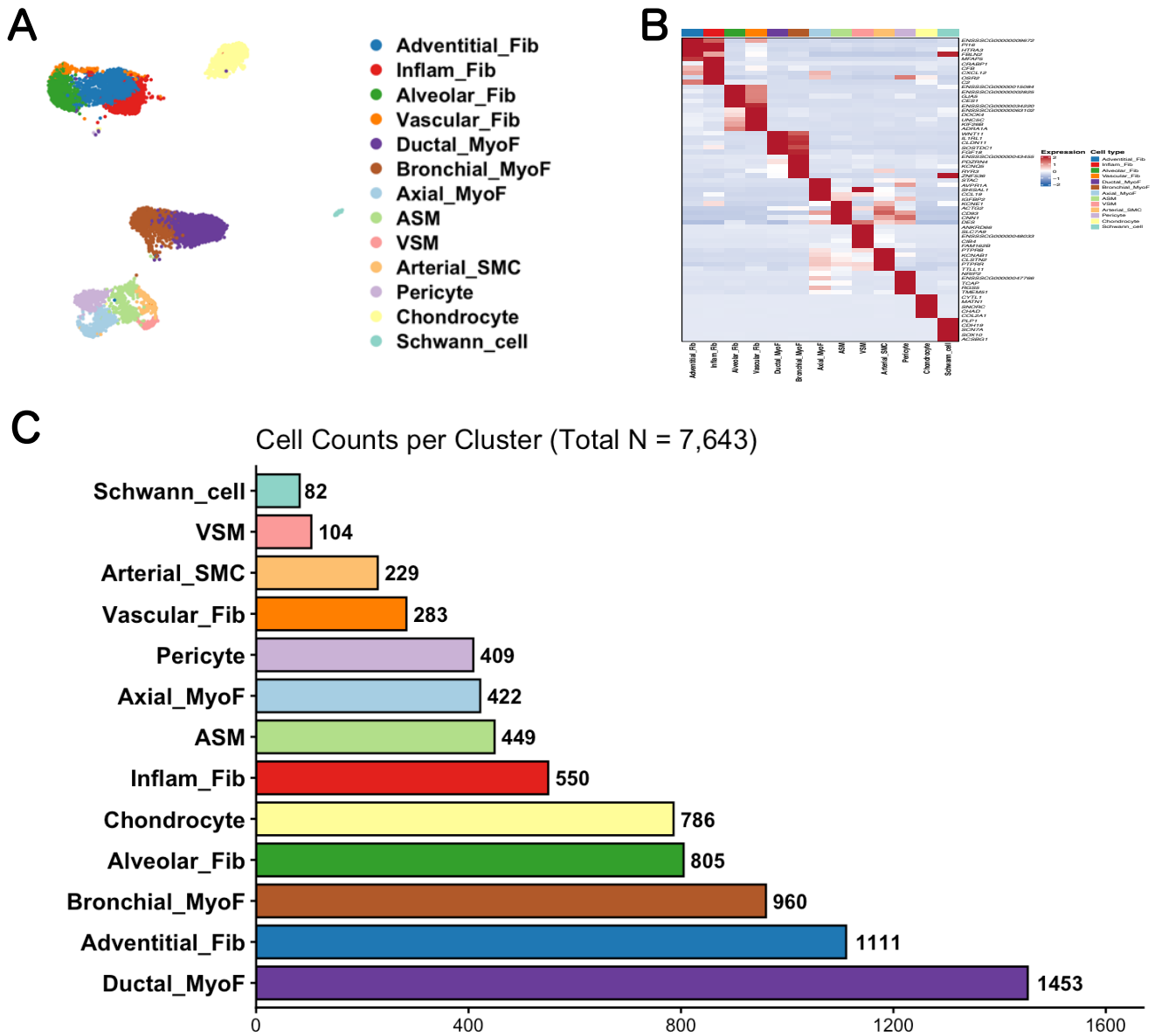
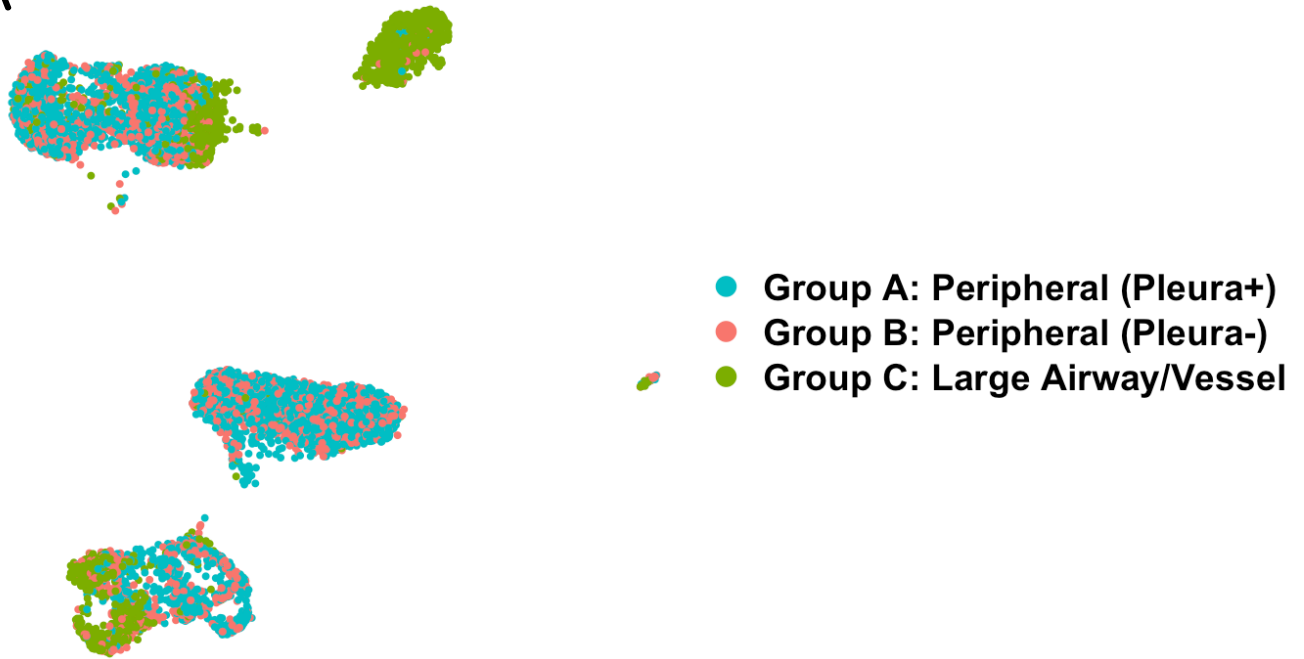
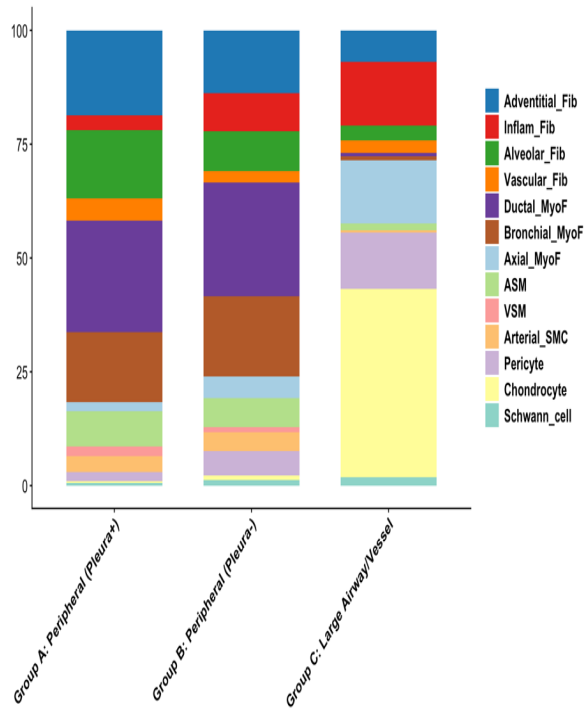


図2 COL1A1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

A



B



C

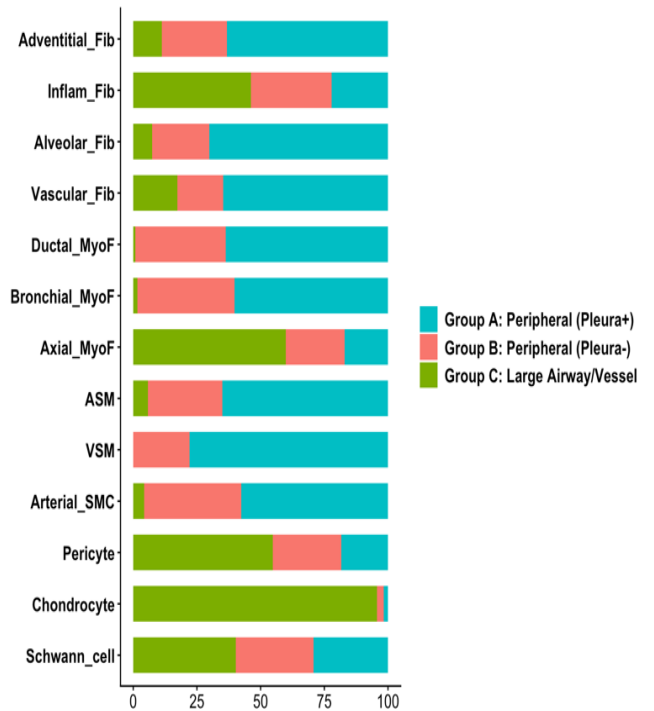


図3 サンプリング領域ごとの割合

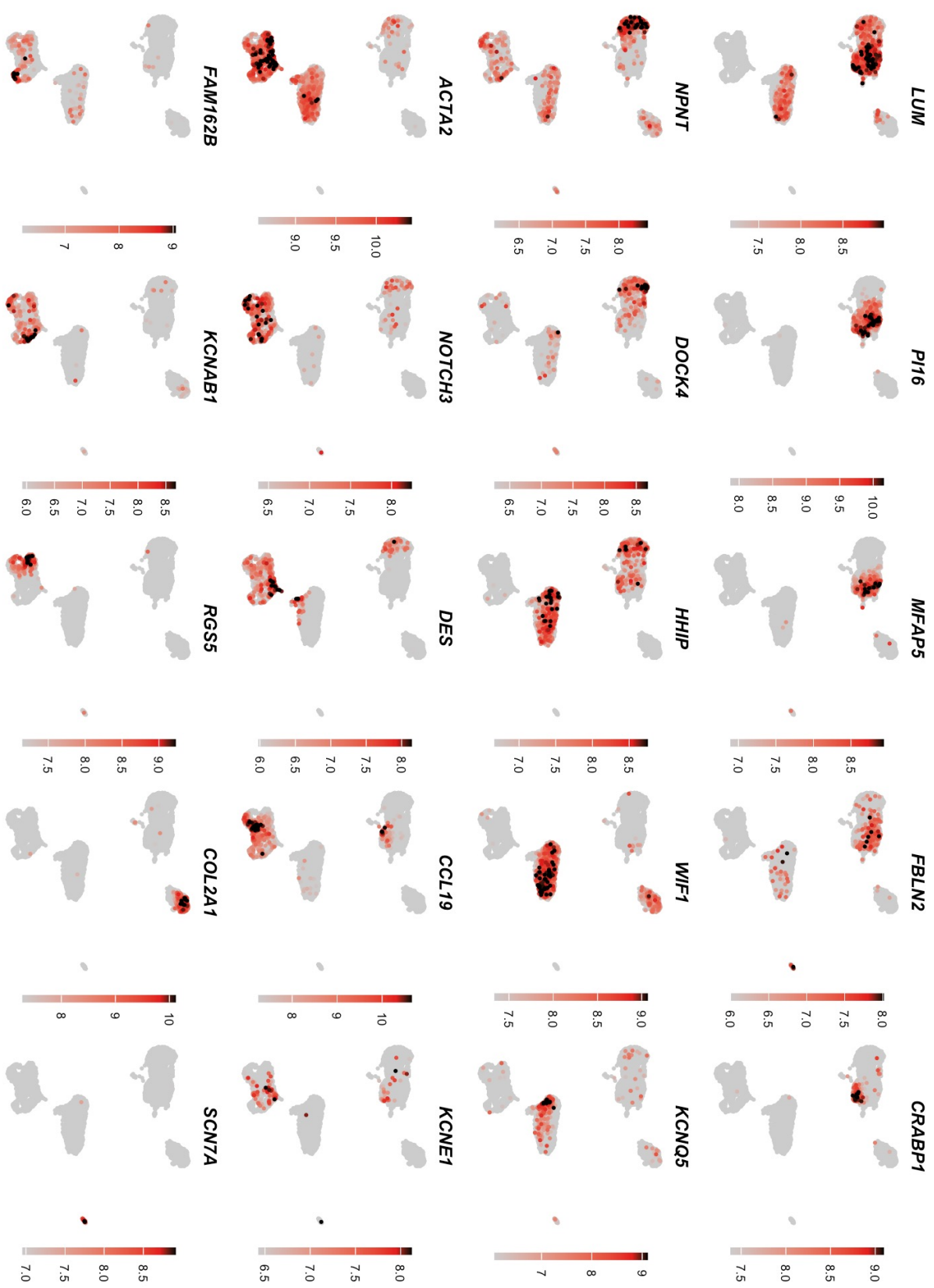


図 4 マーカー遺伝子を用いたFeaturePlot

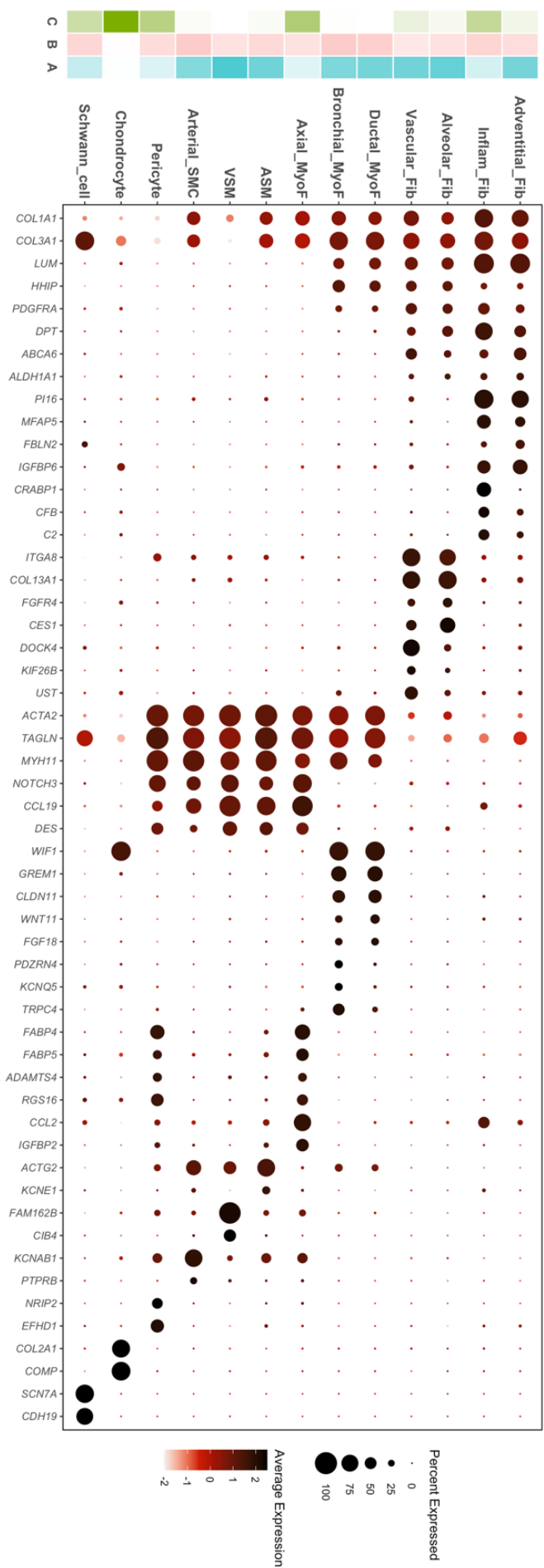
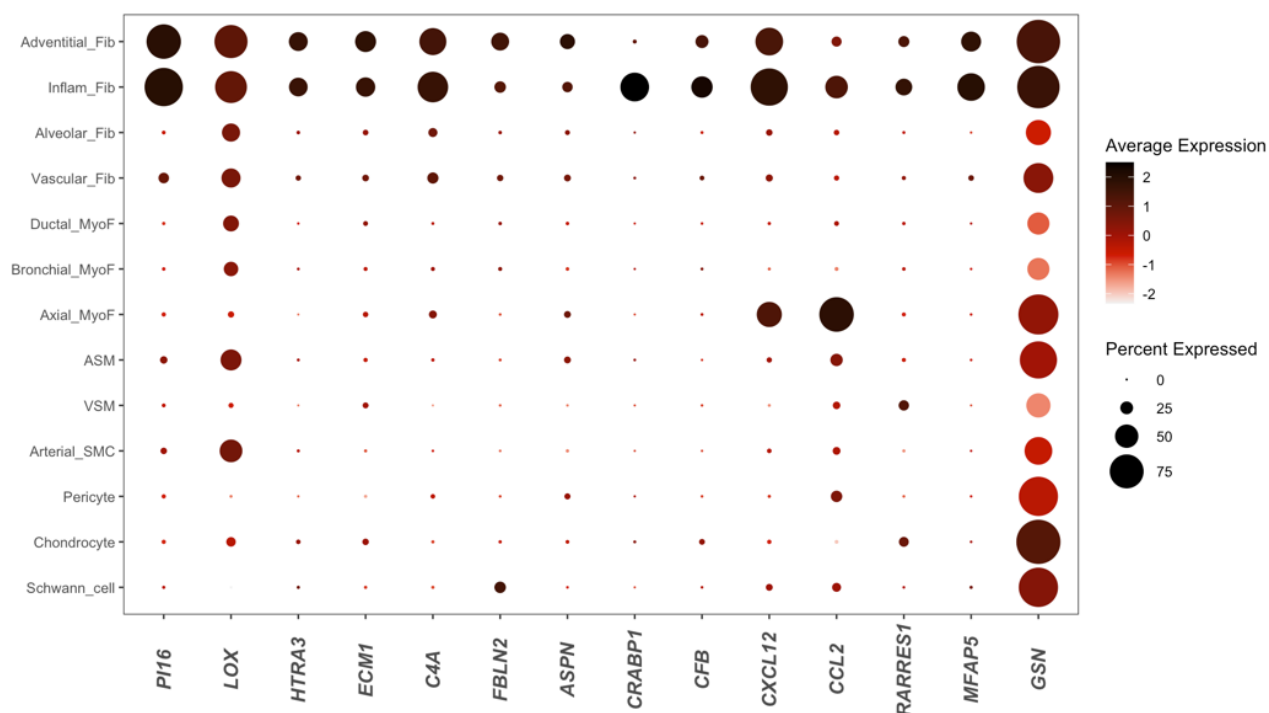


図5 マーカー遺伝子を用いたDotplot

A



B

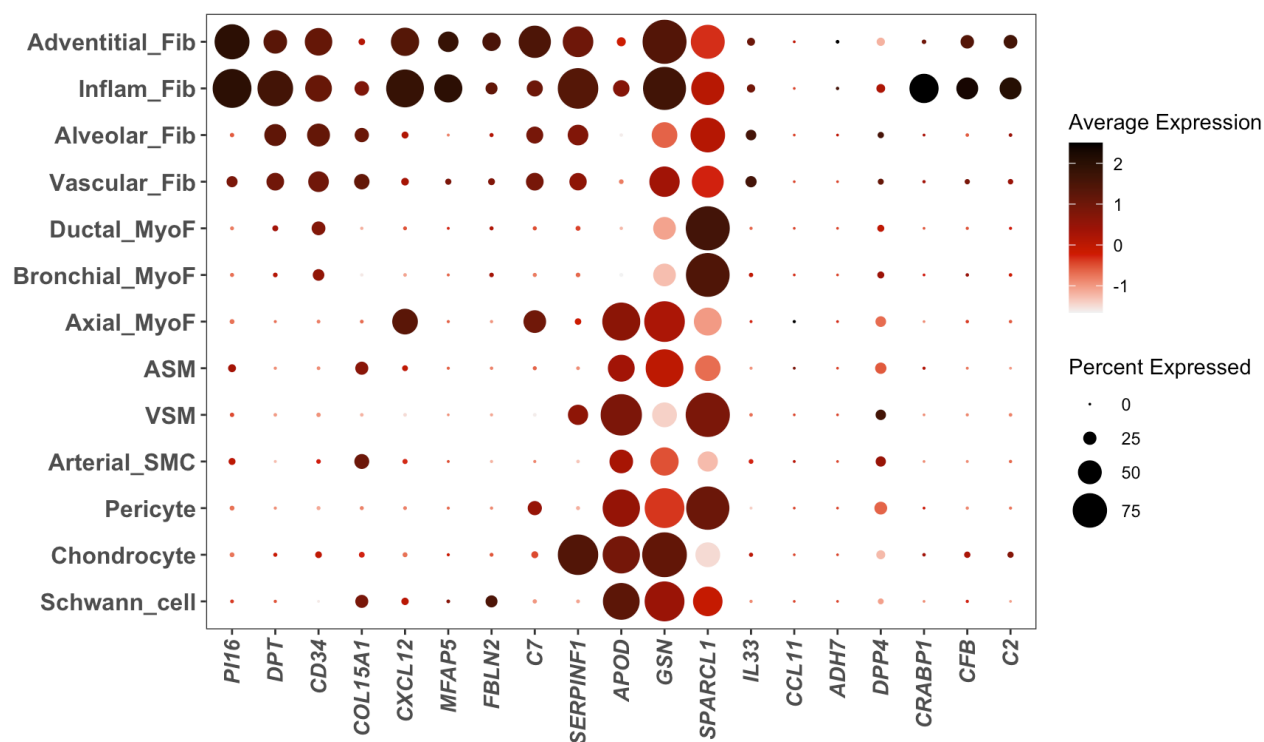


図6 AdvF/InflamFの遺伝子シグネチャー特徴

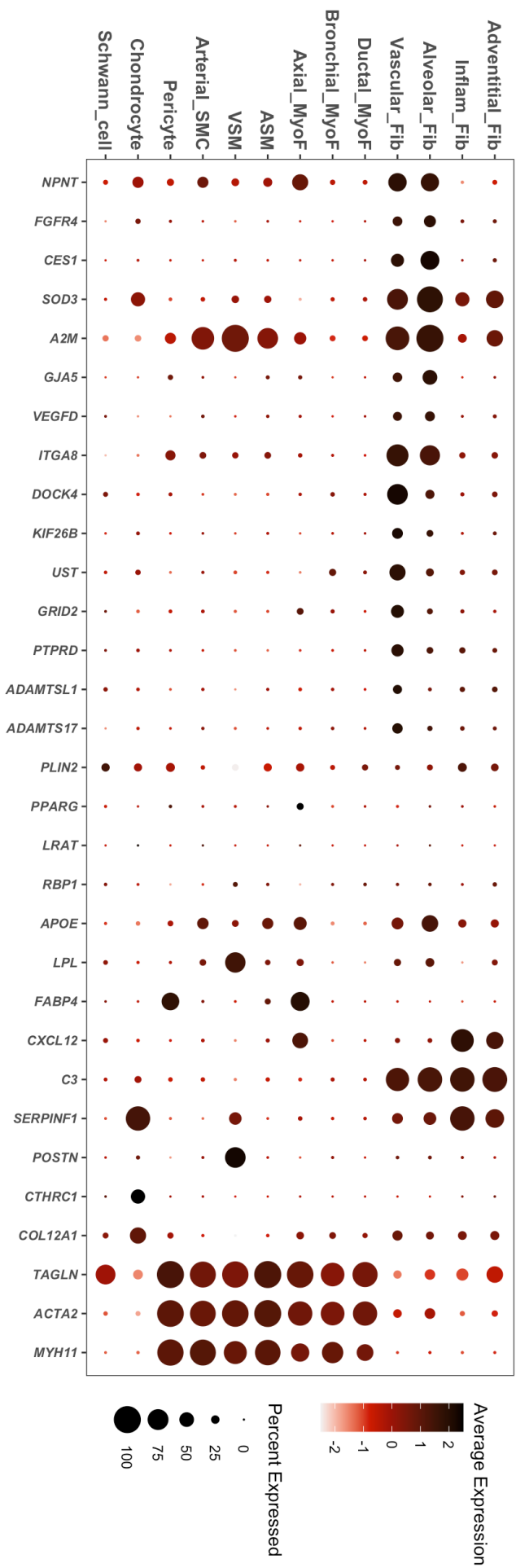


図7 AlVFの遺伝子シグネチャー特徴

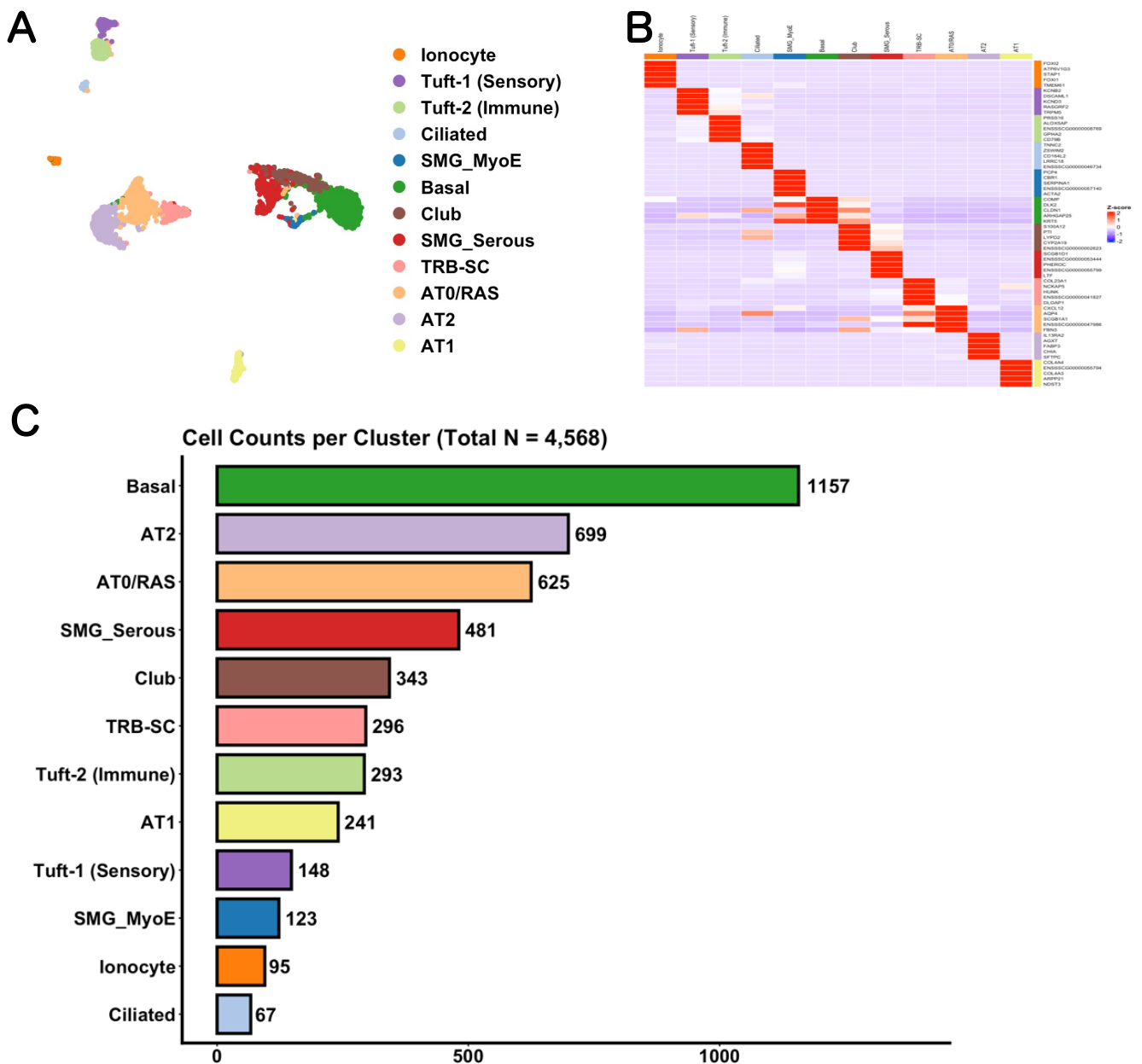
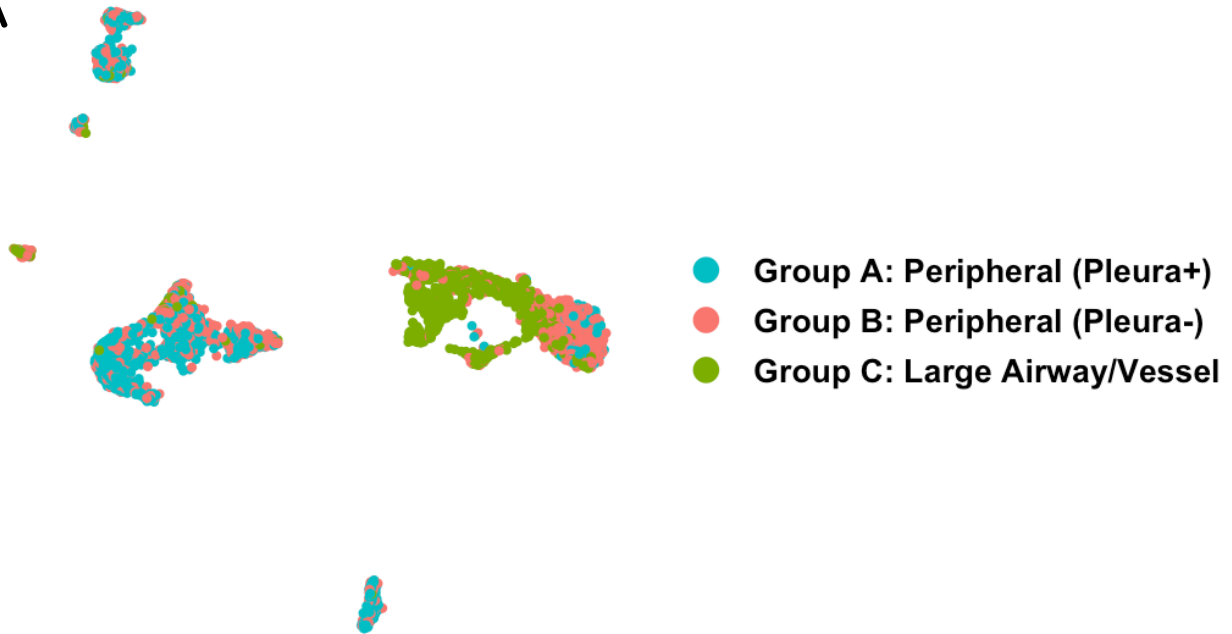
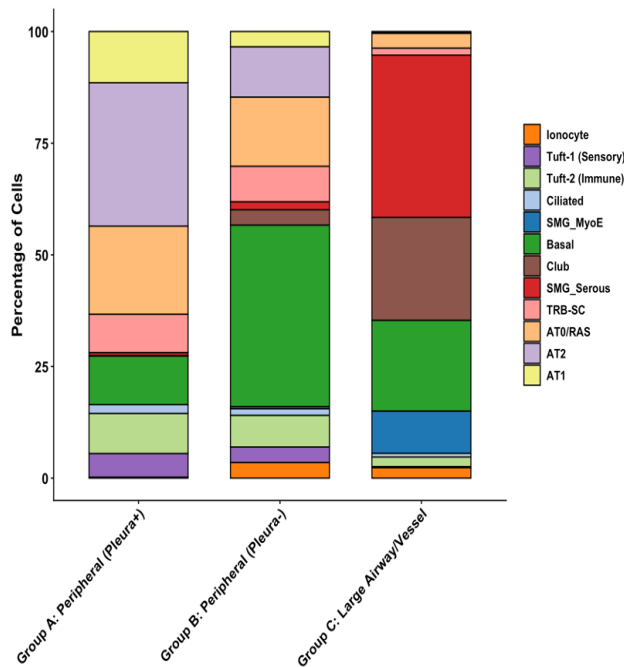


図8 EPCAM/CDH1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

A



B



C

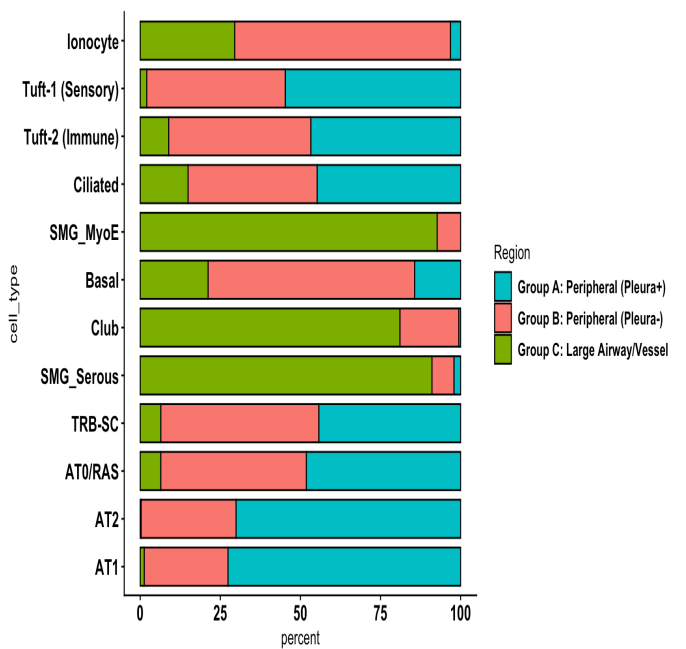


図9 サンプリング領域ごとの割合

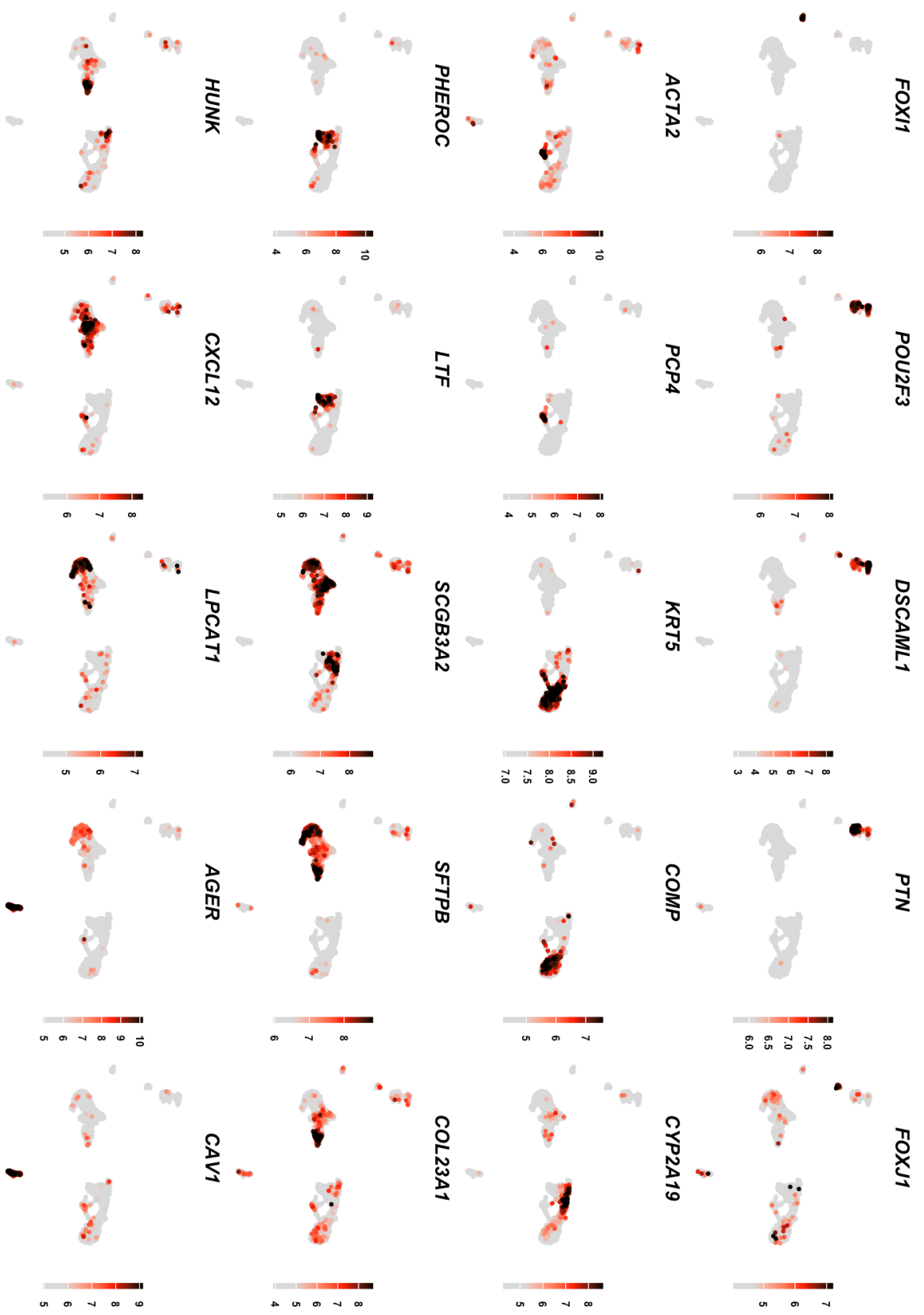


図10 マーカー遺伝子を用いたFeaturePlot

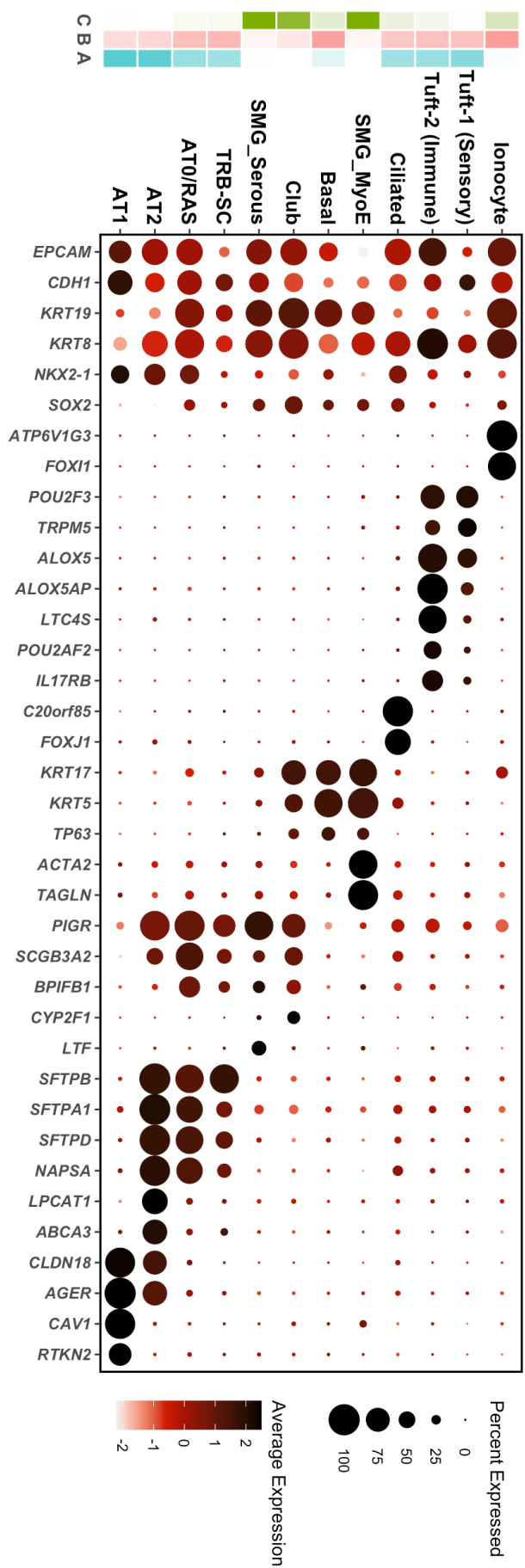


図11 マーカー遺伝子を用いたDotplot

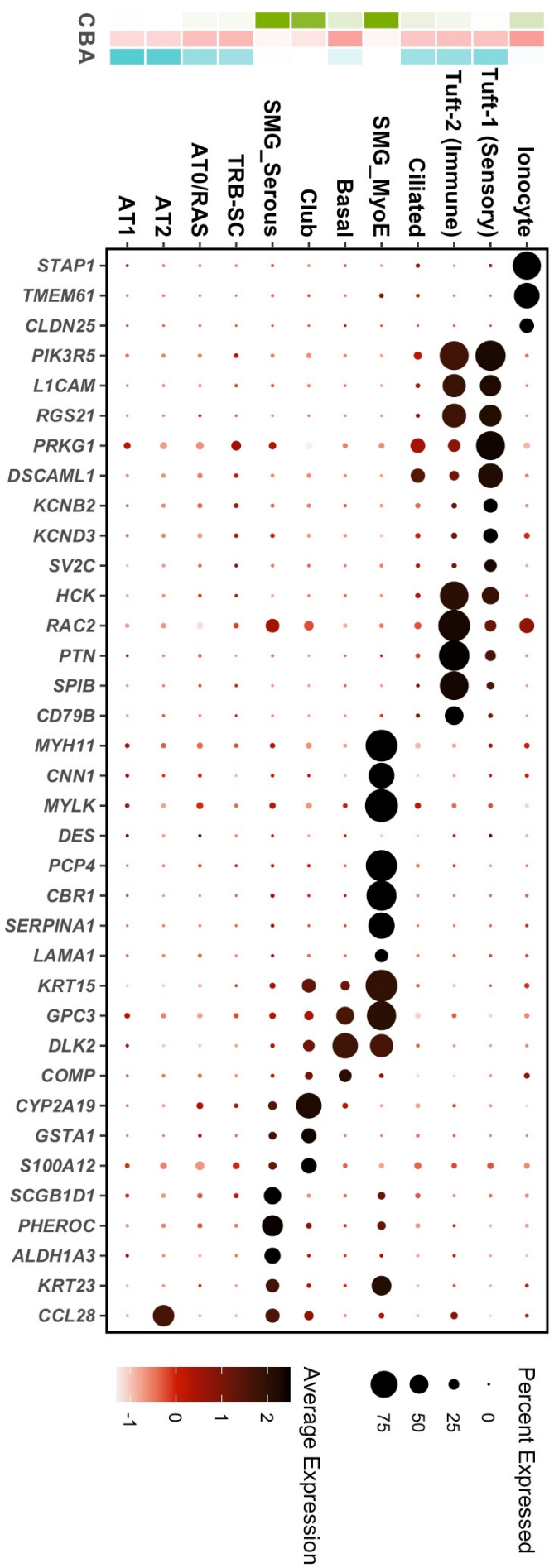
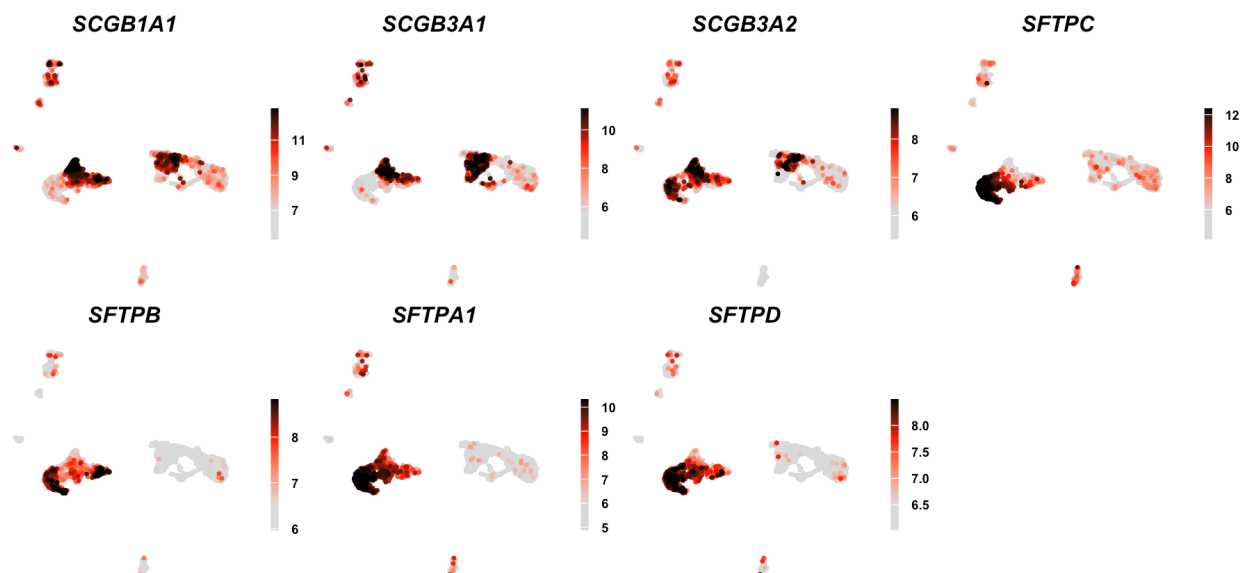


図12 Ionocyte, Tuft1/2, SMG, Basal, Clubに関する追加マーカー

A



B

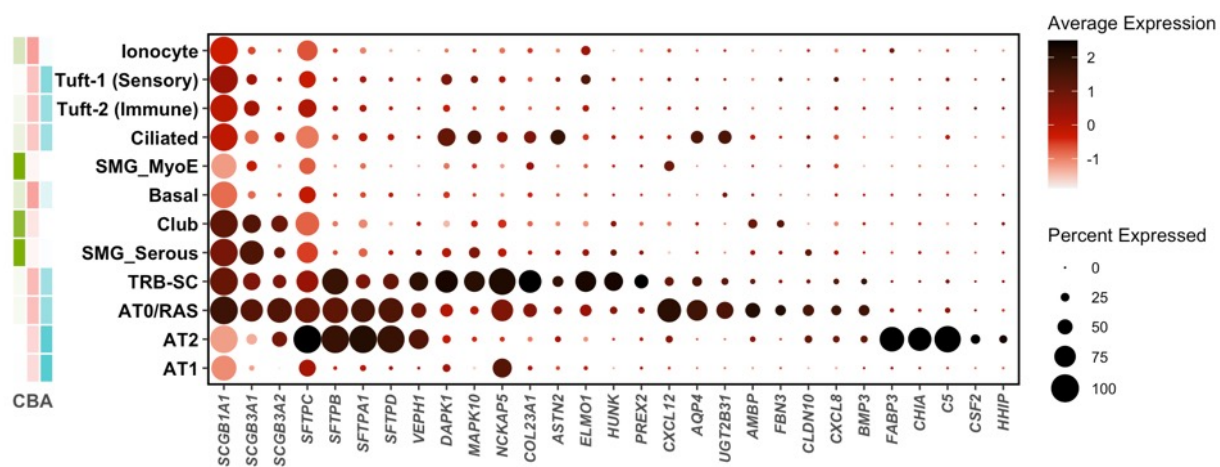


図13 TRB-SC, AT0/RAS, AT2に関する追加データ

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7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研究（240202-02）
分担研究項目：石綿線維の計測

研究分担者 山野 莊太郎 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

マイクロミニピッグを用いた石綿関連疾患モデルの開発において、被験動物へ投与した物質の物理化学的特性を精密に把握することは、試験の客観性と再現性を担保する上で極めて重要である。本研究では、特注の長線維石綿試料（クロシドライトおよびアモサイト）を対象に、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた形態計測を実施した。計測にあたっては、神山法プロトコルを適用し、環境省委託事業等を担う岡山労災病院アスベスト疾患研究・研修センターにて精密な実測を行った。

計測の結果、クロシドライトにおいて1 mgあたり約14億1400万本（幾何平均長：1.34 μm 、幾何平均径：0.11 μm ）、アモサイトにおいて約1億3600万本（幾何平均長：2.05 μm 、幾何平均径：0.24 μm ）という基礎データを算出した。両線維ともに個数比率では5 μm 以下の短線維が大部分（85～92%）を占めていたが、電子顕微鏡観察により、本試料の特性である100 μm を超える超長線維の存在も確認された。

本知見は、既存の物理化学的知見と高度に整合する客観的なデータであり、現在進行中の長期動物投与試験、およびシングルセル解析等による1細胞解像度での分子病態解明において、曝露条件を科学的に定義するための重要な基礎情報となるものである。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

本プロジェクトで実施しているマイクロミニピッグを用いた長期曝露試験において、動物に投与した被験物質（石綿線維）の物理化学的特性を精密に把握することは、試験の再現性と科学的妥当性を担保する上で不可欠である。特に、石綿関連疾患の病態形成は線維の「本数」や「サイズ（長さ・径）」に強く依存するため、投与検体中の線維密度を正確に定量する必要がある。本研究では、特注の長線維試料（クロシドライトおよびアモサイト）について、国内有数の専門機関である岡山労災病院アスベスト疾患研究・研修センターに計測を依頼し、疾患モデルの曝露条件を科学的に定義することを目的とした。

B. 研究方法

1. 計測プロトコルと標本作製:

神山宣彦先生（労働安全衛生総合研究所フェロー）の指導の下、「長繊維アスベスト試料のサイズ測定方法（神山法）」を適用した。カーボン抽出法により標本作製し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて15,000倍の倍率で各線維の長さ・幅を精密に計測した。

2. 計測・計算手法（参考文献の引用）:

計測結果の要約および計算については、高田らの論文（Takata et al., 2009）のTable 1を参考とした。

- **濃度算出式:** 以下の数式を用いて、試料内の線維濃度（本数/ml）を算出した。
濾過面全体の線維本数 = 実測石綿本数 × (濾過面積 201.06 mm² / 観察面積)
試料内石綿線維濃度（本数/ml） = 濾過面

全体の線維本数 × 希釈倍率 / 使用量 (1 ml)

- 観察条件: 濾過面積は直径 16 mm (201.06 mm²) とし、網目 1 辺 110 μm (面積 0.0121 mm²) の Ni 製グリッドを使用した。クロシドライトは 10 網目 (0.121 mm²)、アモサイトは 30 網目 (0.363 mm²) を無作為に抽出して観察した。

C. 研究結果

1. 実測データと濃度:

- **クロシドライト (1,000倍希釈):** 実測 851 本 (うち 1 μm 以上 498 本)。算出された濃度は 1.414 × 10⁹ 本/ml (約 14 億 1400 万本/mg 相当) であった。
- **アモサイト (500倍希釈):** 実測 492 本 (うち 1 μm 以上 409 本)。算出された濃度は 1.36 × 10⁸ 本/ml (約 1 億 3600 万本/mg 相当) であった。

2. EDS元素分析による同定 (図1A, 図2A):

エネルギー分散型X線分析 (EDS) により、各線維の化学組成を確認した。

- **クロシドライト:** 酸素 (O)、ケイ素 (Si)、鉄 (Fe) の強いピークに加え、ナトリウム (Na) およびマグネシウム (Mg) が検出された。これはクロシドライト (青石綿) 特有の組成 (Na-Fe系角閃石) を裏付けるものである。
- **アモサイト:** 酸素 (O)、ケイ素 (Si)、鉄 (Fe)、マグネシウム (Mg) に加え、マンガン (Mn) が検出された。これはアモサイト (茶石綿) に特徴的な化学組成であり、検体の真正性が確認された。

3. 形態分布 (Table 1):

幾何平均長はクロシド

ライト 1.34 μm 、アモサイト 2.05 μm であり、両者ともに線維長の大部分（約 85～92%）が 5 μm 以下であった。

D. 考察

1. 計測結果の信頼性と客観性

本計測により、「クロシドライトはアモサイトに比べ線維本数が約 10 倍多い」という結果が得られたが、これは小西淑人先生（JASFM専務理事）の「アモサイトの方が密度（比重）が大きい」という知見と高度に整合する。本計測データの信頼性を担保する要因として、環境省からの委託で労災認定や補償審査に関わる肺内石綿計測を担う、岡山労災病院の専門家（宮本洋輔先生、妹尾純江技師ら）の手によって本データが算出された点である。この高度な客観性と信頼性は、将来的な国際学術誌への論文投稿において、曝露条件の正確性を担保する客観的な根拠となる。

2. 線維長分布が病態形成に及ぼす影響と本研究の学術的意義

本計測の結果、投与検体であるクロシドライトには 5 μm 以下の短線維が数的に多く含まれていることが明らかとなった（Table 1）。しかし、本研究で用いた試料は石綿原綿からの粉碎・篩、及び液相沈降の10回繰り返しによる調製により作成された特注品であり、実際には100 μm を超える超長線維が含まれていることを電子顕微鏡観察にて確認している。これら「線維長の多様性」が病態に及ぼす影響について、近年のレビューおよび古典的知見に基づき考察する。

2.1. 5 μm 以上の長さの線維の重要性と公的機関の見解

これまでの主要な公的機関および権威ある研究において、5 μm という長さは、健康リスクを評価する上での重要な「閾値」として扱われてきた。特に、米国毒性物質・疾病登録局（ATSDR）や米国環境保護庁（EPA）の専門家パネルは、「5 μm 未満の短線維が人間に癌を引き起こす可能性は低い（あるいはリスクはゼロに近い）」との合意を示している。また、Stanton et al. (1981) は、直径 0.25 μm 以下、かつ長さ 8 μm 以上の線維（Stanton fibers）が最も高い発がんポテンシャルを持つことを示しており、Barlow et al. (2017) の包括的レビューにおいても、ヒトの疾患リスク増大には 10～20 μm 以上の線維長への曝露が必要であると結論づけられている。

2.2. 石綿肺（間質性肺疾患）と線維長の関係における課題

石綿の物理的特性と疾患の関係については、中皮腫や肺がんといった発がん性を主座に議論されてきた経緯があり、「石綿肺（肺線維症）」や「びまん性胸膜肥厚」といった非腫瘍性疾患の進展プロセスと線維長の相関については、系統的な報告がいまだ十分ではない。過去の限定的な報告では、Vorwald et al. (1951) が 20～50 μm の線維が細気管支周囲の線維化を引き起こす一方で、20 μm 未満では明瞭な線維化が見られなかったと指摘している。

2.3. ブタ肺における線維の挙動と病態進展の作業仮説

本プロジェクトの独自性は、齧歯類には存在しない「小葉間隔壁」や発達した「呼吸細気管支」を有するブタを用い、ヒトと極めて類似した解剖学的環境下で石綿病態を再現している点にある。今回の計測で確認された 92%の短線維群は、肺深部の肺泡領域まで到達し広範な初期炎症に関与すると予測される。一方で、混在する 100 μm 超の長線維は、マクロファージによる完全な貪食が不可能な「不完全貪食（Frustrated phagocytosis）」を誘発し、特定の組織境界部（呼吸細気管支壁や小葉間隔壁など）に長期間留まることで（Biopersistence）、石綿肺特有の進行性線維化の主要な要因となっている可能性が高い。この「線維長の多様性」が実際の組織内でどのように局在し、疾患責任細胞を活性化させているかを次世代解析技術（TAS-Seq等）で解明するためには、まず投与された線維の総量（曝露強度）が疾患モデルとして妥当であるかを検証する必要がある。

3. 曝露用量の妥当性評価と疾患モデルとしての生物学的意義

本研究で設定した曝露条件の妥当性を、先行研究および行政的基準との比較により検証した。

3.1. 先行研究（ラットモデル）との整合性

参考文献である Takata et al. (2009) では、ラットに対し石綿 1 mg を単回投与することで、投与後540日まで持続する酸化ストレスと進行性の肺線維化を誘発している。これを体重換算（体重約200 g想定）すると5 mg/kgBWとなり、本プロジェクトでマイクロミニピッグに採用した用量と整合する。

3.2. ヒトの労災補償基準との比較

日本における労災認定等の医学的判定基準では、石綿曝露の客観的証拠として、「乾燥肺1 gあたり5 μm 以上の石綿線維が200万本以上」約4億本（ $2 \times 10^6 \times 200$ ）以上の長線維が残留している必要がある。

3.3. 本研究における曝露強度の科学的結論

今回の計測の結果、投与に用いたクロシドライトに含まれる5 μm 以上の長線維は全体の8.0%であった。ブタ1頭（体重 10 kg 計算）あた

りの総投与量50 mgに含まれる長線維の本数を算出すると、約56.6億本($50 \times 1.414 \times 10^9 \times 0.08$)と算出された。これはヒトの補償基準(約4億本)の約14倍に相当する長線維を肺内へ直接投与したことに相当し、限られた観察期間内で「不完全貪食(Frustrated phagocytosis)」とそれに続く慢性炎症を安定して誘発するための疾患モデルとして、病態形成を誘発するのに十分な曝露強度である。以上のことから、「5 mg/kgBW(ブタ1頭あたり長線維56.6億本)」という設定は、ラットの先行研究等動物実験との整合性、およびヒトの労災補償基準との比較においても、モデルとしての妥当性が極めて高い数値であると結論づけられる。

E. 結論

神山法プロトコルおよび岡山労災病院の計測技術を統合し、Takata et al. (2009) に準拠した解析手法を用いることで、被験物質の物理化学的特性に関する精密な定量評価を完了した。本知見は、マイクロミニピッグ疾患モデルにおける線維曝露量と病態進展の相関を解明する上での標準データ(リファレンス)となり、次世代の先進的医学解析と統合した詳細な病態検討に供されるものである。

F. 引用文献

1. Takata A, Yamauchi H, Toya T, et al. (2009). Forsterite exposure causes less oxidative DNA damage and lung injury than chrysotile exposure in rats. *Inhalation Toxicology*, 21(9): 739–746.
2. Stanton MF, Layard M, Tegeris A, et al. (1981). Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(5): 965–975.
3. Barlow CA, Grespin M, Best EA. (2017). Asbestos fiber length and its relation to disease risk. *Inhalation Toxicology*, 29(12-14): 541–554.

G. 研究発表

5. 論文発表

- 48) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026 Feb 16(4):230. <https://doi.org/10.3390/nano16040230>
- 49) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 50) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33. doi:

10.1186/s41232-025-00396-z.

- 51) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.
- 52) 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.

6. 学会発表

- 42) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 - 第16回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-第17回大気バイオエアロゾルシンポジウム2026年2月
- 43) 梅田ゆみ, 山野荘太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変 第73回日本職業災害・医学会学術大会2025年11月
- 44) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生 日本産業衛生学会 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会2025年10月
- 45) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出 フォーラム2025 衛生薬学・環境トキシコロジー2025年9月
- 46) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは? 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム2025年度 若手支援技術講習会2025年9月
- 47) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kmiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025) 2025 Sep
- 48) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による 職業性肺疾患研究の新展開 第13回 日本繊維状物質研究学術集会2025年8月 招待有り
- 49) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変 第42回 エアロゾル科学・技術研究討論会2025年8月
- 50) 山野荘太郎、梅田ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出 第38回発癌病理研究会2025年8月
- 51) 山野荘太郎、梅田ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する 第98回 日本産業衛生学会2025年5月

H. 謝辞

本研究における石綿線維の精密計測および試料調製にあたり、多大なるご協力をいただいた関係各位に深く感謝の意を表する。

線維状物質評価における国内有数の知見を有し、本研究の特注長線維に最適化された特別な計測プロトコル（神山法）をご作成・ご指導いただいた独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所の神山宣彦フェロー研究員に心より感謝申し上げます。

また、厚生労働大臣より石綿製造の許可を受けた日本でも稀有な研究所において、石綿原綿からの粉碎・篩、及び液相沈降の10回繰り返しという極めて困難な工程を経て、本実験に不可欠な特注線維を

製造・提供してくださった一般社団法人日本繊維状物質研究協会（JASFM）の小西淑人専務理事に深く御礼申し上げます。

最後に、環境省からの委託による実臨床患者の計測業務等の多忙な公務の間を縫って、熟達した経験と技術により極めて精度の高い実測データを算出していただいた、岡山労災病院アスベスト疾患研究・研修センターの宮本洋輔センター長代理、および妹尾純江技師に厚く御礼申し上げます。

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

いずれも該当なし

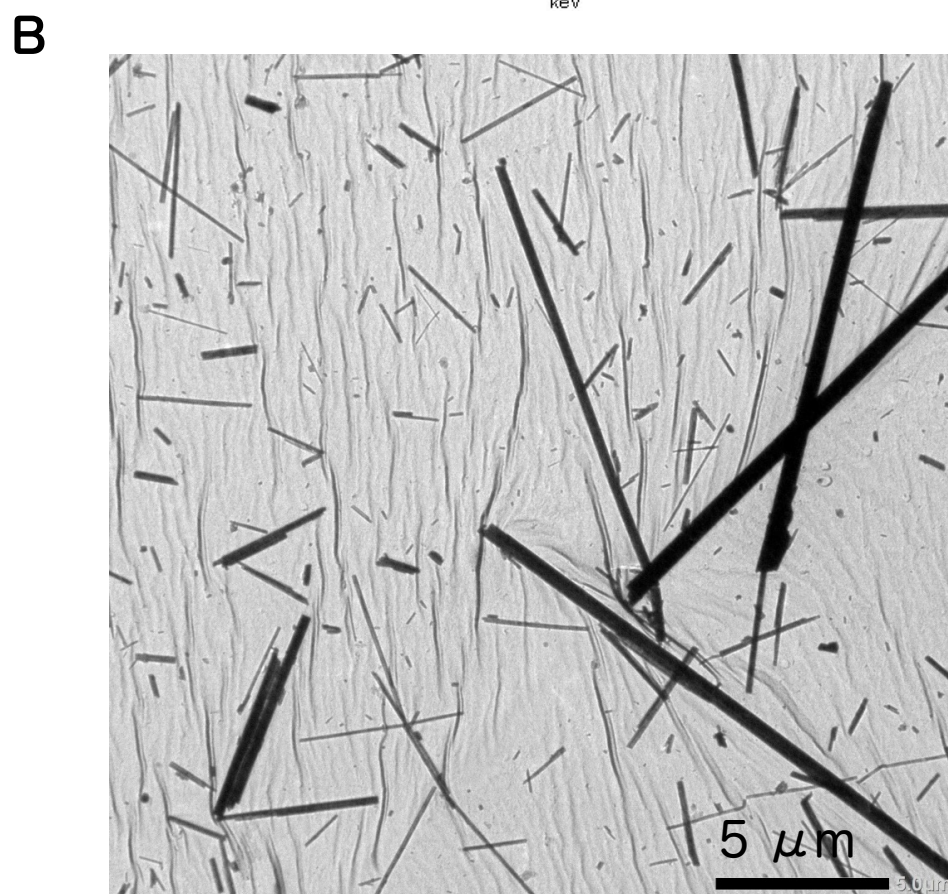
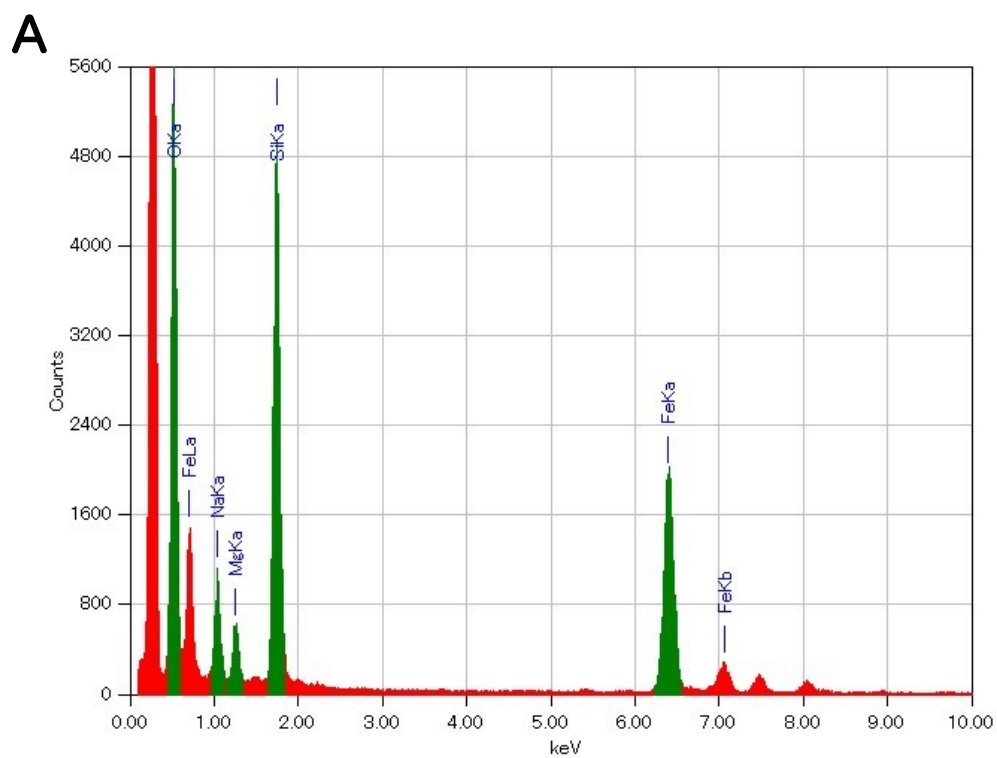
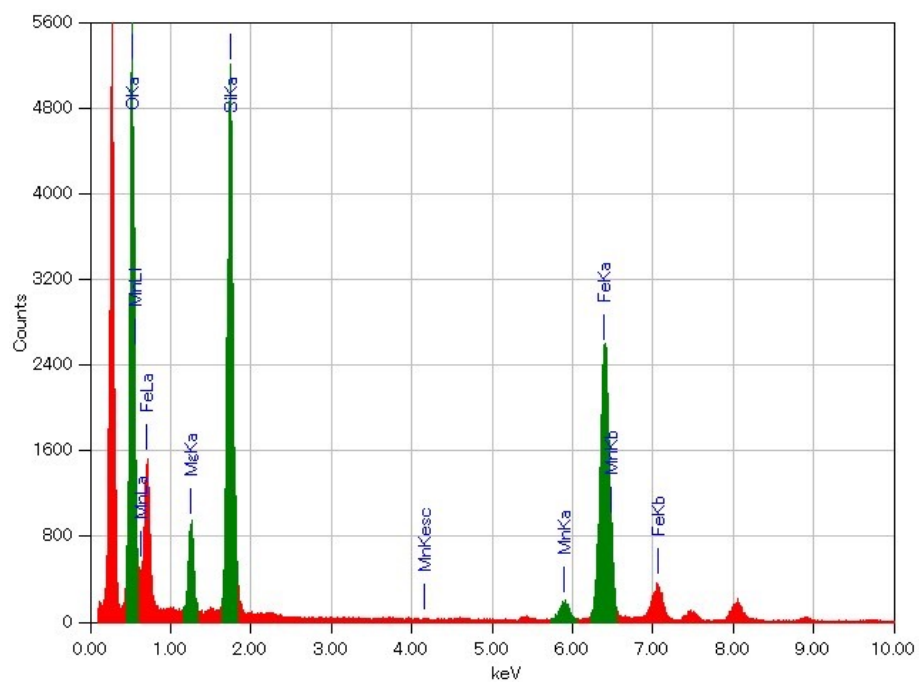


図1 クロシドライト線維のEDS結果及びTEMによる線維画像

A



B

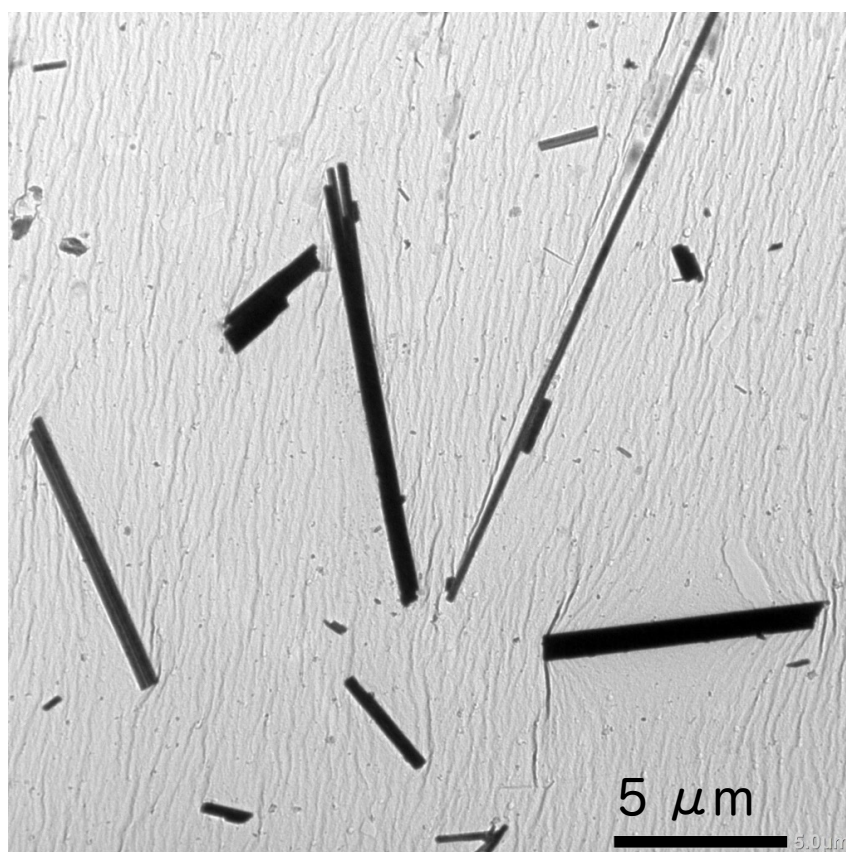


図1 アモサイト線維のEDS結果及び
TEMによる線維画像

Sample	Number of fibers (x 10 ⁶ /mg)							Geometric mean length (um)	Geometric mean diameter (um)	
	Total fibers (x10 ⁶ /mg)	Length category (um)			Diameter category (um)					
		<5	5-20	≥20	<0.1	0.1-0.5	0.5-1.0			≥1.0
Crocidolite	1,414	783 (92%)	66 (7.8%)	2 (0.2%)	344 (40%)	500 (58.8%)	6(0.7%)	1 (0.1%)	1.34 (1.92)	0.11 (1.63)
Amosite	136	422 (85.8%)	63(12.8%)	7 (1.4%)	40 (8.1%)	365 (74.2%)	73 (14.8%)	14(2.8%)	2.05 (2.07)	0.24 (1.81)

Values are presented as number of fibers (percentage of total fibers).
SD: Geometric standard deviation.
Total fibers are calculated based on a suspension concentration of 1 mg/ml.

表 1 石綿線維2種の形態計測結果

1. はじめに

一般の粒子サイズはその粒子の直径（平均径）で表されるが、アスベストのような繊維状粒子は長さ（長さ）と幅の2つのサイズで表現される。特に長繊維試料は粒子の長さ（アスペクト比）が極めて大きいので、正確なサイズ分布を求めるには、試料中の最も長い繊維から短い繊維まで偏りなく計測することが肝心である。計測手段としては、繊維の長さ（長さ）と幅を正確に測定できる透過電子顕微鏡（TEM）が必要になる。

今回の長繊維アスベスト試料は、クロシドライトとアモサイトの100 μ mを超す長繊維を多く含むように長繊維試料作製を行ったということである。

TEMを用いた繊維計測は、下記のように行う。①試料懸濁液の調整、②TEM観察標本の作製、③繊維サイズ測定、および④サイズ分布の表現。

2. 試料懸濁液調整方法

- (1) 今回対象の長繊維試料の懸濁液試料を調整し、そこから適当量の懸濁液を採取する。まず、約100mgの試料粉末から四分法を2度繰り返して数mgを分取し、更に四分法で約1mgを取り、その重量を小数点以下5桁（=0.01 mg）まで正確に秤量する。容量150~200ml程度の蓋付きガラス瓶に入れ、100mlのイソプロピルアルコール（IP）を注ぎ、超音波分散器等を使って良く分散させて試料計測用母液とする。
- (2) その計測用母液から約1mlの試料を採取する。採取は、試料計測用母液を振とうして試料粒子を良く分散させながらピペットで試料液を分取して、混合セルロースエステル・メンブランフィルター（MCE フィルター、直径25mm、有効径16mm）にろ過捕集する。このときのMCE フィルターのろ過面積は2cm²になる。
- (3) 試料計測用母液からのピペットによる分取量は、最終のTEMメッシュ上の繊維粒子の存在量を左右するので、繊維サイズ計測時にTEMメッシュの目開き上の全ての粒子のサイズを計測できるように、粒子は重なりが少なく一様に分散するように気を付ける。しかし粒子数が少なすぎると多くの目開きを計数しなくてはならなくなるので、最適の分取量を見つけることが肝心である。そのため、予め数段階の分取量を取り、MCE フィルターにろ過捕集しておくといよい。

3. 透過電顕観察標本作製方法

TEM観察標本は、試料粒子をろ過捕集したMCE フィルターからカーボン抽出法により作製する。カーボン抽出法は、MCE フィルター上に分散している試料粒子の状態をそのまま保つので、TEM観察で偏りの少ない繊維サイズ計測ができる。

カーボン抽出法は、下記の各ステップを踏んで行う。操作フローを添付の図1に示す。

- ① MCE フィルターを半切にし、スライドグラスにろ過捕集面をスライドグラスに向けて載せ、アセトン蒸気を噴霧する。アセトン蒸気噴霧は専用の装置（Quick Fix）を用いる。
- ② その透明化フィルターを接着したスライドグラスを低温灰化装置で灰化する。
- ③ 灰化処理後、スライドグラス上の灰化フィルターの周囲をセロハンテープで隈取りする。
- ④ その隈取りした内側に8%ポリビニルアルコール（PVA）溶液を適当量（数ml）滴下して一昼夜乾燥させる。滴下量はその多少により乾燥後のPVA膜の厚さが変わるので、最適膜厚を得るために注意が必要である。

- ⑤ 乾燥後のスライドグラスにカーボン蒸着を厚めに施す。
- ⑥ カーボン蒸着を施したスライドグラスの試料面にメスで 3mm 角の升目を軽く入れた後、セロハンテープ枠ごと取り外し、そのまま全体を 500ml ビーカーの熱水上に静かに乗せ PVA 膜を溶解させる。熱水はビーカーを電子レンジで数分間加熱して沸騰させ、予めスパチュラ等でかき回して突沸させておく。その熱水ビーカーはマッフル炉等に入れて、水滴が落ちないようにした蓋をする。僅かに加熱して冷却速度を遅らせながら 1~2 時間放置する。
- ⑦ ⑥で PVA 膜が溶解しカーボン膜のみとなった浮遊試料カーボン膜を TEM メッシュで掬い上げる。浮遊試料カーボン膜は 3mm 角の切れ目が入っているので、TEM メッシュで一個一個掬い上げ易くなっている。なお、TEM メッシュは、目開きが 200 μ m~250 μ m 程度のものを用い、100 μ m 超の長繊維粒子もその多くが一目開き内に納まるようにする。
- ⑧ 掬い上げた TEM メッシュは、ろ紙上の新たなスライドグラスのエッジ部分に並べて置いて風乾させ、観察標本とする。

4. 繊維サイズ測定方法

- ① TEM 観察は出来るだけ低倍率（1000~2000 倍程度）で実施し、TEM メッシュのどの目開きにも長繊維から短繊維までの粒子が均等に分散していることを確認する。
- ② つぎにその倍率（000~2000 倍）で撮影する。
- ③ 撮影画面は、10 倍から 20 倍に拡大してプリンターの用紙にプリントする。
- ④ プリント画面上で繊維の長さや幅を測定する。長さは物差しでもいいが、幅はスケール付きルーペで読み取る。
- ⑤ ③と④は液晶画面上で計測する場合も、繊維幅の計測は拡大するなどしてその精度に気を付けること。
- ⑥ 繊維計測は、300~500 粒子を計測する。

5. サイズ分布の表現方法

計測繊維サイズは、長さ、幅を関連付けて Excel 等に生データを記録する。

- ① 長さや幅の散布図を作成する。
- ② 長さや幅の幾何平均と幾何標準偏差を求める。
- ③ 対数正規分布図表にプロットする。

6. おわりに

繊維サイズの計測は、試料の懸濁液を作る段階から偏りのないようにするなど、注意が必要である。特に透過電顕観察標本作製方法は、最も経験とノウハウを必要とする。

7. 参考文献

Kohyama N and Kurimori S (1996) A total sample preparation method for the measurement of airborne asbestos and other fibers by optical and electron microscopy, *Industrial Health* **34**, 185-203.

図 1. カーボン抽出法の標本作製方法のフロー図

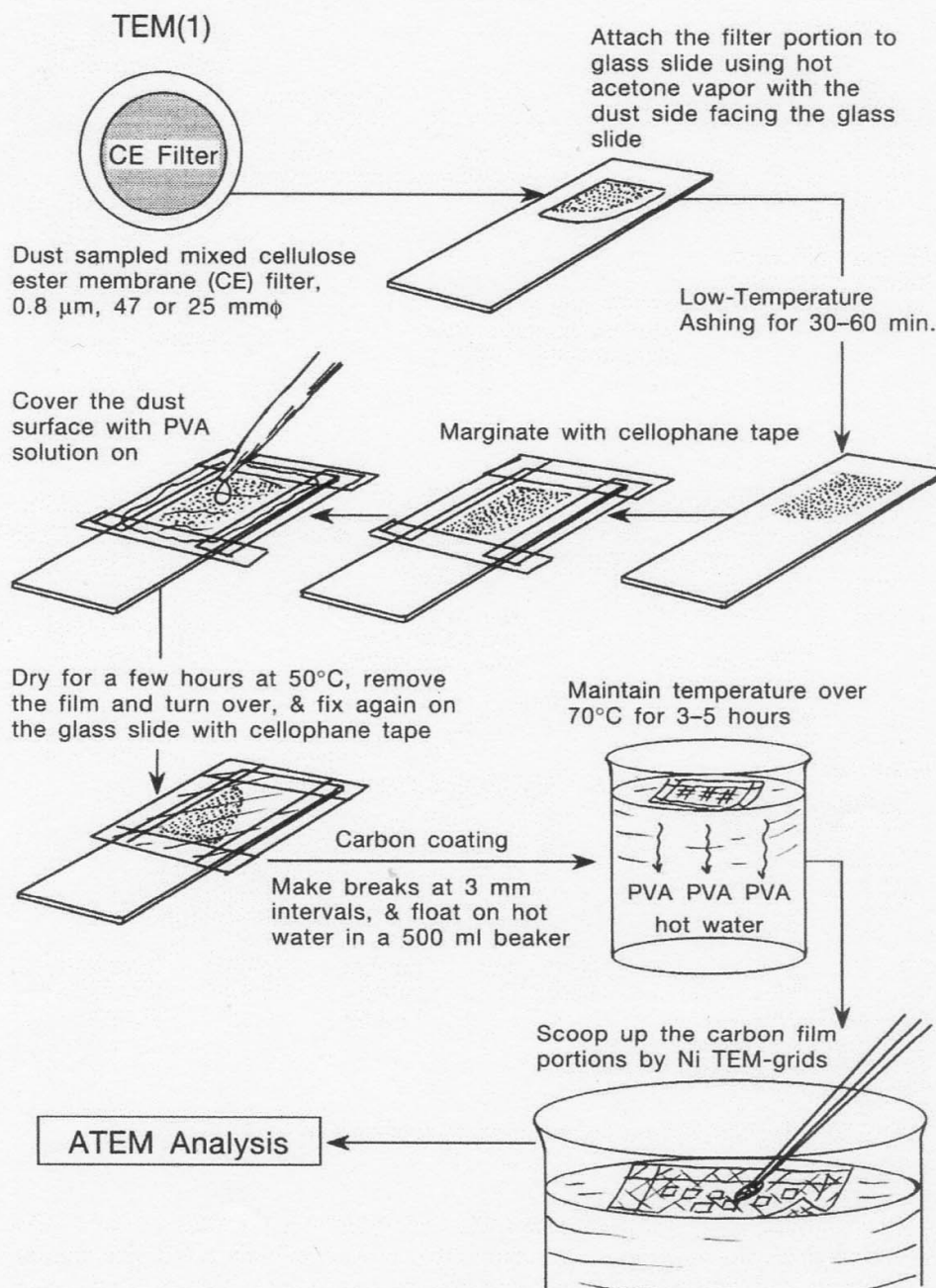


Fig. 4. Flow chart of the sample preparation method for TEM(1).

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7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（2年）

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

昨年度から継続して、石綿暴露による肺病態を解明することを目的とした「マイクロミニピッグ 8 頭を用いた 2 年間の長期モニタリング」を実施している。通常、いわゆる産業豚は成体で 200 kg を超えることから長期の安全性評価試験には適さないが、マイクロミニピッグは成体でも 30 kg 未満に維持されるため、本研究のような長期的な臨床観察が可能となる。

昨年度に実施した被験物質（クロシドライト）の投与後、日次の健康観察、月次の体重測定、および 3 か月ごとの胸部 CT 撮像と血液・血液化学検査を継続している。被験物質の投与および CT 撮像に際しては、麻酔専門チームの支援によるイソフルラン吸入麻酔下での適切な処置を行うとともに、実験実施者の安全確保にも万全を期している。

加えて、本研究は動物福祉に深く配慮し、岐阜大学動物実験委員会の承認を得た上で、日本実験動物医学専門医の指導下で実施されている。被験動物は国際的基準に準拠した環境下で飼育されており、日本実験動物医学専門医による厳密な医学的管理を実施している。週次のモニタリングにおいても、呼吸器系を含めた一般状態に異常は認められず、全 8 頭において健康状態は良好に維持されている。本研究は現在も継続中であり、2027 年 1 月の解剖までこの安定した管理体制を維持することで、大型実験動物を用いた長期石綿曝露研究として、極めて信頼性の高い解析データの取得が期待される。

A. 研究目的

昨年度、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、2 年間のモニタリングを開始した。この実験に用いる実験動物として、マイクロミニピッグを選択した。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ることで、この長期観察が可能となるからである。

昨年度、マイクロミニピッグ 8 頭に石綿を投与した後、毎日、被験動物の状態を観察するとともに毎月、体重を測定し、3 ヶ月ごとに CT イメージの獲得および血液・血液化学検査を実施した。これにより、石綿投与後の影響を臨床的に評価した。

なお、昨年度に石綿を投与した個体の 2 年間のモニタリングは 2027 年 1 月まで継続する。

B. 研究方法

1) 使用動物と投与物質

マイクロミニピッグ 8 頭を富士マイクラ株式会社（静岡）より導入した。使用したマイクロミニピッグは全てメスである。導入後、馴致期間を経たのち、実験を実施した。

8 頭全てのマイクロミニピッグに対して 5 mg/kgBW の用量で PBS に懸濁したクロシドライト線維を経気管支内経路で左肺後葉へ投与した。

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、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、被験物質の投与時には、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。

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、その後は 3 ヶ月ごと胸部 CT イメージを取得した。CT イメージの取得は継続中であり、来年度も、6 月、9 月、12 月に撮像を予定している。

撮影の当日は絶食とした。先述の MMB の筋肉内投与で鎮静、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 12 kV、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。

CT イメージの取得は、岐阜大学動物病院麻酔科チームによる適切な麻酔管理下で行われた。

(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。

実験を開始する前に、本研究の詳細に関連する学生・スタッフに説明した。説明を理解し、了承した者のみが研究に参加した。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説明した。

年度が替わり、新たに研究室に所属した学生・スタッフにも同様の説明を実施し、了承した者のみが研究に参加した。

今回、雌のマイクロミニピッグを使用した。雄は成長に伴って上下顎犬歯が発達することから、飼育者に対する怪我等のリスクを防止することを目的に雌を使用した。

C. 研究結果

石綿投与 2 年間のモニタリング実験は、現在も継続中である。毎日の個体観察、毎月の体重測定、3 か月ごとの CT 撮像および血液・血液化学検査を継続している。

被験動物は、米国 National Research Council の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals の基準に従った環境で、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の管理下で飼育されている。なお、同基準は、実験動物の管理と使用に関するガイドラインとして国際的にも広く認知されており、その概念はわが国の各省庁基本指針や日本学会会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (2006 年)」にも反映されている。

図 1 に示すとおり、被験動物の体重は問題なく推移している。また、CT 撮像時に実施する血液ならびに血液化学検査の結果からも、動物の維持管理は良好になされていると考えられる。

被験動物の様子は、専用の PC で記録・管理されている。マイクロミニピッグの異常を速やかに察知するために、この情報を関係者全員が共有している。ま

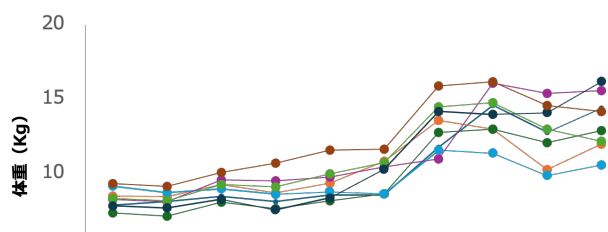


図 1 飼育動物の体重変化。ここでは 3 ヶ月ごとの体重変化をグラフ化している。被験動物の様子は、専用の PC で記録・管理され、異常を速やかに察知するために関係者全員が共有している。また、毎週のミーティングで飼育管理の良否を議論し、給餌量や室温などの調整を行っている。

た、毎週のミーティングで飼育管理の良否を議論し、給餌量や室温などの調整を行っている。加えて、日本実験動物医学専門医による日々の臨床観察において、現在までに全 8 頭において咳嗽、喘鳴、および努力性呼吸といった呼吸器症状は一切認められていない。活力および食欲といった一般状態も極めて良好に維持されており、被験物質 (クロシドライト) の肺内投与に起因する臨床的な全身状態の悪化や衰弱も観察されていない。以上の臨床所見から、本疾患モデルの作製プロセスは、動物の生理機能を著しく損なうことなく、長期観察に耐えうる極めて安定したものであることが確認された。

D. 考察

被験動物の状態は良好に維持されていると考えられる。また、何らかの異常が生じた時に速やかに対応できる体制も構築できている。以上のことから、このまま 1 月の解剖まで現状を維持していくことで、これまでに実施されたことのない「長期にわたる大型実験動物を用いた石綿研究」を完遂できると考えられる。特筆すべきは、石綿投与後 1 年を経過した現時点においても、全個体が臨床的に極めて健全な状態を維持している点である。専門医の指導下で厳密な健康管理を行うことにより、呼吸器系への局所的な病変形成を許容しつつ、個体としての生存性と活力を高い水準で両立できている。このことは、R8 年度に予定している最終解剖において、偶発的な死亡例によるデータ欠損のリスクが極めて低いことを示唆しており、長期曝露試験として高い精度での完遂が現実視される。

E. 結論

繰り返しになるが、2 年間にわたる観察は順調に遂行できている。1 月の解剖まで、現状を維持していくことで、これまでに実施されたことのない長期にわたる大型実験動物を用いた石綿研究」を完結できると考えられる。

G. 研究発表

- 論文発表
- 1) Umemura, A. and Takasu, M.: Sense-Science-Significance model: A museum education framework for engaging visitors with cultural heritage. J. Mus. Educ. In press
- 2) Ohki, T., Miyawaki, S., Higa, T., Yamazaki, H., Okaki, H., Nakajima, R., Kitamura, K., Nakagawa, M. G., Sanosaka, T., Tsugawa, H., Honda, K., Hirata, A., Goto, T., Handa, M., Tokutake, K., Saeki, S., Yamamoto, M., Watanabe, K., Maeda, S., Takasu, M., Sugiura, S., Takiuchi, T., Kohyama, J., Suematsu M. and Hirata, H.: Identification of endometrial CD169+ macrophages essential for Treg cell accumulation and implantation. Cell Report. In Press.

- 3) Miyake, T., Kawano, Y., Kahihara, T., **Takasu, M.**, Takagaki, T., Fujimoto, S., Kawaguchi, T., Kagemoto, K., Kida, Y., Okamoto, K., Sogabe, M., Muguruma N., Tsuneyama, K., Sato, Y. and Takayama, T.: Orthotopic esophageal cancer xenograft model in immunosuppressed microminipigs for near-infrared fluorescence endoscopy. *Cancer Sci.* In Press
 - 4) Doi, S., Kobayashi, Y., Takashima, S., Ide, W., Murahata, Y., Yayota, M., **Takasu, M.**, Sassa-O'Brien, Y. and Shibata, Comparison of serum paraoxonase 1, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase activities among dogs, cats, micromini pigs, and goats. *J. Vet. Med. Sci.* In press
 - 5) Thaw, P., **Hano, K.**, Saito, I., Kanda, T., **Kitagawa, H.** and **Takasu, M.***: Establishment of a step-down FSH superovulation protocol in microminipigs for zygote collection. *In Vivo.* 40: 89-98, 2026.
 - 6) Yoshihara, T., Tozaki, T., Kawate, K., Furukawa, R., Kikuchi, M., Ishige, T., Kakoi, H., **Takasu, M.** and Hobo, S.: SNP array-based genomic inbreeding and relatedness analyses in an endangered Japanese equine breed, the Taishu horse. *Livestock Sci.* 304: 105898, 2026.
 - 7) Umeda, Y., Izawa, T., Kazama, K., Arai, S., Kamiie, J., Nakamura, S., **Hano, K.**, **Takasu, M.**, Hirata, A., Rittinghausen, S. and Yamano, S.: Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J. Toxicol. Pathol.* 38: 113-129, 2025.
 - 8) 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, *Equine Vet. J.* 144:105233, 2025.
 - 9) 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.
 - 10) Izumi, M., **Hano, K.**, Hirata, A., Thaw, P., Seki, A., Tanaka, M., Ochi, K., Suganami, T., **Kitagawa, H.** and **Takasu, M.***: Glucose and insulin responses following streptozotocin administration for the induction of a type 1 Diabetes Mellitus model in microminipigs. *J. Vet. Med. Sci.* 87: 1122-1127, 2025.
 - 11) Hagiwara, H., Hayashi, Y., Mori, K., **Hano, K.**, **Takasu, M.**, Asai, A., Kato, K. and Tadayoshi Aoyama.: Visualizing ambiguity in semantic segmentation of ICSI support systems for polar-body detection. *SICE JCMSI* 18: 2548044, 2025.
 - 12) Wu, B., Shichino, S., Ueha, S., Matsukiyo, R., Ishimura, Y., Ogiwara, H., **Takasu, M.**, Yamano, S., Umeda, Y. and Matsushima, K.: Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm. Regen.* 45: 33, 2025.
 - 13) Ohki, T., Kitamura, K., Tokutake, K., Saeki, S., Yamamoto, M., **Takasu, M.** and Hirata, H.: Depletion of CD169⁺ Border-Associated Macrophages Induces Parkinson's disease-Like Behavior. *Front. Neurosci.* 19:1688394, 2025.
- 2) 学会発表
 - 1) 神田光輝, 七野成之, 杷野一輝, 北川均, 高須正規. RNA-seq を用いたブタ単為発生胚盤胞と生体内受精胚盤胞におけるトランスクリプトームの比較. 第 169 回 日本獣医学会 2025 年 9 月 宮崎(優秀発表賞)
 - 2) 斉藤海星, 名倉由起子, 梅原格, 高島康弘, 杷野一輝, 神田光輝, トーパイン, 泉満里愛, 坂本祐太郎, 北川均, 高須正規. マイクロミニピッグの腔マイクロバイオーム解析. 第 169 回 日本獣医学会 2025 年 9 月 宮崎
 - 3) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kmiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025) 2025 Sep
 - 4) Norihisa Miki, Takashi Ota, Masaki Takasu, Yoshihiko Kanno. IMPLANTABLE ARTIFICIAL KIDNEY FOR HYBRID RENAL REPLACEMENT THERAPY. WCN26-AB-7152, 2026. Yokohama
 3. その他
 - 1) 大田能士, 菅野義彦, 三木則尚, 村尾咲香, 高須正規. 次世代透析デバイスの開発とその展望. 日本透析医会雑誌 40: 448-455, 2025.
 - 2) 高須正規. マイクロミニピッグをプラットフォームとした再生医療研究. 2025 年度 One Medicine 創薬シーズ開発・育成研究教育拠点シンポジウム. 岐阜
 - 3) 高須正規. ミニブタを用いた臓器再生プラットフォームの構築. 東海小児腎臓病理研究会. 名古屋

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

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：ブタ肺からの標的細胞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少なく、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。前年度、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。本年度は当該技術に基づき、Crosidolite（青石綿）を肺内2頭ならびに胸腔内2頭に投与した、計4頭の豚の1細胞RNA-seqデータを取得し、細胞の種類の分類ならびに青石綿投与肺と対照群の非投与肺組織の比較解析を実施した。各個体につき正常部と病変部につき、CD45/CD31 陽性、陰性量集団の解析を可能とするため、CD45/CD31 陽性、陰性各細胞集団を磁気分離して解析し、総細胞数約18万細胞の1細胞RNA-seqデータを取得した。

その結果、事前検討と同様に、胸腔内2頭より取得した胸膜下組織由来検体において、中皮細胞を十分量(7070細胞)検出することに成功した。さらに、胸膜組織の重要な構成成分である、外膜線維芽細胞(Adventitial fibroblast)もまた胸膜下組織由来検体において濃縮されていた。詳細な遺伝子解析の結果、青石綿の胸腔投与群の中皮細胞において発がん関連遺伝子の活性化が認められた(分担研究者の山本の項を参照のこと)。さらに空間遺伝子発現解析により、同定された活性化中皮細胞、外膜線維芽細胞が近接して存在し、ニッチを形成している可能性が示唆された。これらより、ブタ胸腔内青石綿モデルとヒト疾患との類似性が示唆され、これまで動物モデルで再現困難であった石綿関連疾患の新規動物モデルとしての有用性が示唆された。

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。昨年度、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を確立した。本年度は、前年度の実験系を用い、Crosidolite（青石綿）を肺内2頭ならびに胸腔内2頭に投与した計4頭の豚の1細胞RNA-seqデータを取得し、細胞の種類の分類ならびに青石綿投与肺と対照群の非投与肺組織の比較解析を実施した。さらに、見出された石綿病変特徴的な細胞集団の空間的分布について空間トランスクリプトーム解析により検討した。

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、ヒトに近い石綿関連疾患の新たな疾患モデルの確立とその分子・細胞機能変化の解析を目的としている。岐阜大学にて飼育しているマイクロミニピッグのうち、2頭につき肺内に、2頭につき胸腔内にCrosidolite（青石綿）を投与し、CTにて病変形成が認められた段階で肺を摘出し、前年度確立した方法

にもとづき肺組織(肺内投与群)ならびに腹膜下組織(胸腔内投与群)を凍結保存した。凍結保存検体より単細胞懸濁液を調整し、CD45/CD31 陽性、陰性量集団の解析を可能とするため、CD45/CD31 陽性、陰性各細胞集団を磁気分離により単離し、細胞が十分にとれた検体については1:1の比率で混合し、TAS-Seq2法により1細胞RNA-seq解析を行った。

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, E, CLDN15, SERPINE3)の発現により、また腹膜下組織の特徴的な間質細胞である外膜線維芽細胞(Adventitial fibroblast)を特徴的なマーカー遺伝子(Pi16, Dcn)の発現により同定し、遺伝子発現を評価した。

(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、1細胞RNA-seqデータをUMAPに示した。胸腔内投与群は個体名Rie, Beck, 肺内投与群は個体名Cro, Sidoである。中皮細胞のマーカー遺伝子の発

現パターンを図2に示す。これより、クラスター8が中皮細胞であることが見出され、胸腔内投与群の腹膜下組織においてのみ検出されていることが認められた。

外膜線維芽細胞(Adventitial fibroblast)のマーカー遺伝子を図3に示す。線維芽細胞クラスター(図1のクラスター1,10)の左側の亜集団が胸腔内投与群の腹膜下組織特異的な細胞集団であり、そのなかに、線維化に伴い出現する活性化線維芽細胞の指標であるACTA2陽性、COL1A2強陽性、PI16陽性集団が存在する(図1のクラスター1,10の左下の集団)ことが見出された。

さらに、見出された胸腔内投与群特異的な活性化adventitial fibroblastと中皮細胞の位置関係をしらべるため、肺内投与群および胸腔内投与群ブタのFFPE切片を用い、空間遺伝子発現解析Stereo-seq OMNIを実施した。HE染色結果(図4A)及び空間クラスタリングの結果(図4B)を図4に、scRNA-seq解析により見出された特徴的なマーカー遺伝子発現パターンを図5に示す。

空間遺伝子発現より、肺内・胸腔内投与群共通で見られる病変構造ではなく、胸腔内投与群でのみ認められるCOL1A2強陽性の領域の一部(赤線内部)にて、DCN/ACTA2陽性の活性化したAdventitial fibroblast、およびALOX15陽性の中皮細胞が隣接して存在している可能性が示唆された。

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った。この手法を用いることで、胸腔内青石綿投与ブタにおいて、がんに関連のある遺伝子を高発現する中皮細胞、活性化し線維化関連遺伝子を高発現するadventitial fibroblastが誘導されていることが見出された。さらに空間遺伝子発現解析により、活性化中皮細胞・adventitial fibroblastが近接し、特定のニッチを形成している可能性が示唆された。活性化したadventitial fibroblastは、マウス線維化モデルでは認められず、ヒト線維化肺においてのみ認められることから、今回作成したブタ胸腔内青石綿モデルは、ヒト病態と細胞活性化パターンの観点から近い可能性が見出された。今後さらに病態ステージの進んだ検体を同様に解析をすすめ、ヒト検体データとの比較や、ブタ肺由来細胞を用いたin vitroでの応答解析等を通じ、ブタモデルの有用性や、あらたな治療標的細胞や分子が見出されることが期待される。

E. 結論

ブタの胸膜細胞を1細胞レベルで解析可能な系により、ブタ胸腔内青石綿モデルの胸膜下組織を解析することにより、当該ブタモデルとヒト疾患との類似性が示唆され、これまで動物モデルで再現困難であった石綿関連疾患の新規モデルとしての可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Xu P, Ueha S, Aoki H, Kitabatake M, Chen M, Shichino S, Hara A, Ouj-Sageshima N, Ito T, Motozono C, Matsushima K. Repeated mRNA vaccination and breakthrough infection reveal durable dominance but diminishing recall of vaccine-induced CD8⁺ T-cell clones. International Immunology, dxag004, 2026. (査読有)

2. Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. Inflamm Regen. 45(1):33, 2025. (査読有)

3. Takahashi M, Tsunoda M, Aoki H, Kurosu M, Ogiwara H, Shichino S, Bending D, Ishikawa S, Thaventhiran JED, Matsushima K, Ueha S. A pan-immunotherapy signature to predict intratumoral CD8⁺ T cell expansions. Nat Commun. 16(1):9175, 2025. (査読有)

4. Shirai Y, Enomoto T, Takeda Y, Edahiro R, Takahashi-Itoh M, Noda Y, Adachi Y, Nakayama M, Kawasaki T, Koba T, Futami Y, Yoshimura H, Amiya S, Hara R, Yamamoto M, Nakatsubo D, Suga Y, Naito M, Masuhiro K, Matsuki T, Hirata H, Iwahori K, Nagatomo I, Miyake K, Koyama S, Fukushima K, Shiroyama T, Naito Y, Futami S, Natsume-Kitatani Y, Ose N, Funaki S, Nojima S, Shichino S, Yanagawa M, Shintani Y, Nogami-Itoh M, Adachi J, Inoue Y, Tomonaga T, Okada Y, Mizuguchi K, Kumanogoh A. Serum vesicle biomarkers reflect the disease activity of idiopathic pulmonary fibrosis. J Trans Med. 23(1):1102, 2025. (査読有)

5. Matsumoto N, Ueha S, Ueha R, Koyama M, Yamakawa K, Sato T, Goto T, Kono T, Shichino S, Matsushima K, Kondo K. HPV6-Induced Gene Expression Signature in Recurrent Respiratory Papillomatosis. Laryngoscope. 135(10):3732-3739, 2025. (査読有)

6. Zong C, Sato H, Schneider B, Shichino S, Ueha S, Wu B, Matsushima K, Okayama T, Ikeo K, Urushitani M, Ito H, Iwama S, Fergany A, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Acrylamide-induced noradrenergic axon degeneration is promoted via a non-cell autonomous mechanism, involving microglial Tnfrsf2/TNF- α and oxidative stress pathways. J Hazard Mater. 496:139125, 2025.

7. Niitsu T, Kataoka T, Fukushima K, Motooka D, Shichino S, Natsume-Kitatani Y, Kitamura H, Niwa T, Baba T, Okuzaki D, Kumanogoh A, Akira S, Okudela K, Ogura T. Spatial transcriptomics identifies SPARC as a prognostic marker in interstitial lung diseases. J Pathol. 267(1):79-91, 2025. (査読有)

8. Matsui H, Nagamachi A, Koizumi M, Kudo R, Ajiro M, Harada H, Harada Y, Shichino S, Yoshimi A. Genotype-integrated single-cell transcriptome analysis reveals the role of DDX41 pR525H in a patient with myelodysplastic neoplasms. Sci Rep. 15(1):22849, 2025. (査読有)

9. 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.* 26(1):157, 2025. (査読有)

10. Kohda H, Tanaka M, Shichino S, Arakawa S, Komori T, Ito A, Wada E, Ochi K, Yuan X, Takeda T, Saiki A, Tatsuno I, Ikeda K, Miyai Y, Enomoto A, Morikawa Y, Shimizu S, Ueha S, Matsushima K, Ogawa Y, Suganami T. Novel cell-to-cell communications between macrophages and fibroblasts regulate obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Diabetes.* 74(7):1135-1152, 2025. (査読有)

11. Qiu Y, Tang XX, Shichino S, Kushwaha PP, Sanders YY, Russo RC, Mo C. Editorial: Cellular and molecular mechanisms of lung regeneration, repair, and fibrosis, volume II. *Front Cell Dev Biol.* 13:1653034, 2025. (査読有)

2. 学会発表

1. 七野成之. Biomek i7 による single-cell RNA-seq/T 細胞受容体解析のライブラリ調整自動化の実際と T 細胞の COVID-19 ワクチン応答解析への応用. 第 48 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 口頭, 2025/12/3-5.
2. 七野成之. ゲノム科学の進歩の歴史と、人々の生活や医療への貢献、またその将来の発展の方向性について理解する. 第 18 回 東京理科大学・野田市・流山市 包括連携協定に基づく講演会, 口頭, 2025/12/20.
3. 七野成之. シングルセルオミクス解析法 TAS-Seq ファミリーの開発と疾患研究への応用. 2025 年度データサイエンス医療研究部門・統計科学研究部門 合同シンポジウム, 口頭, 2025/11/29.

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

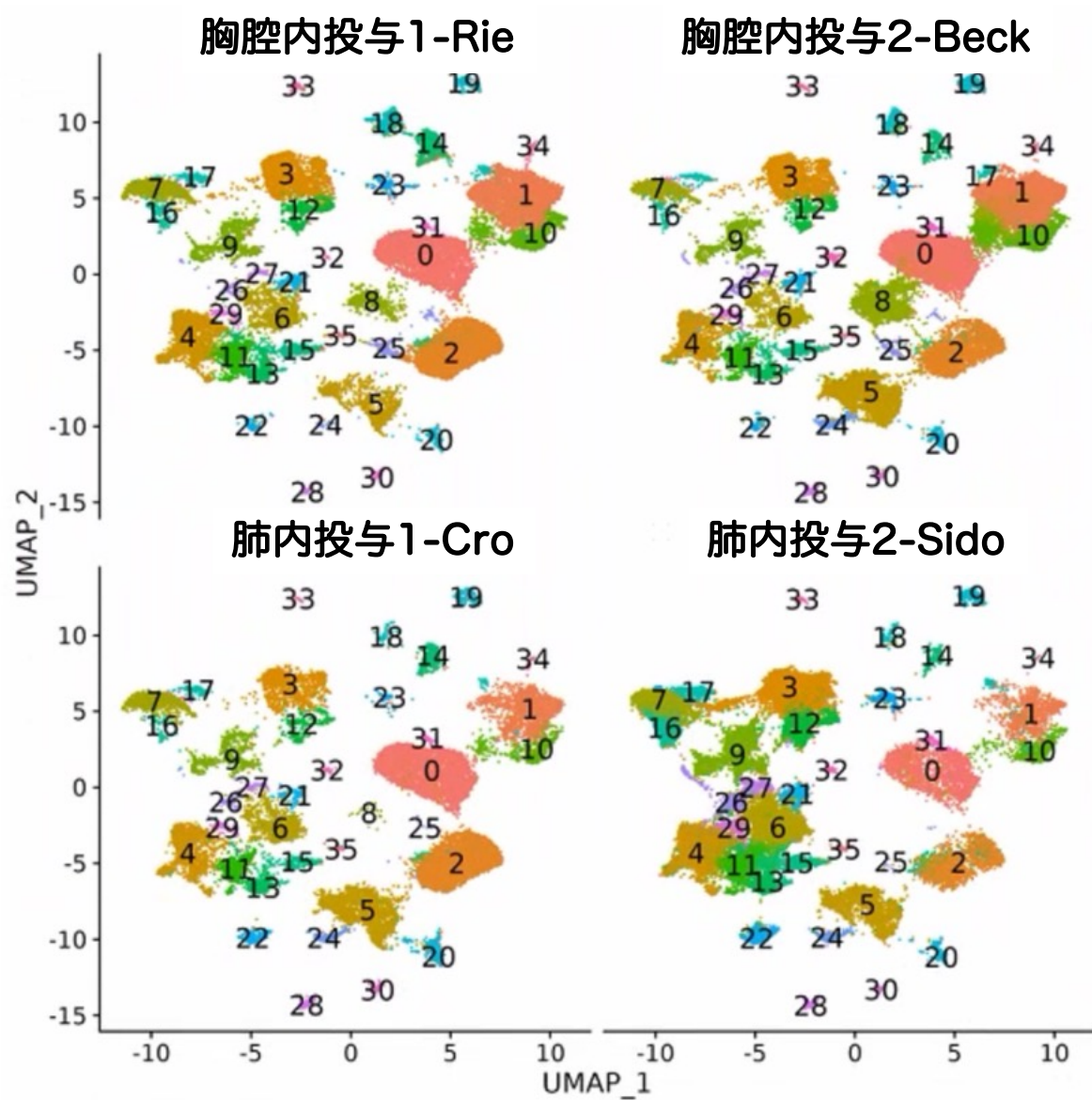


図1 石綿投与ブタ4頭のscRNA-seq解析

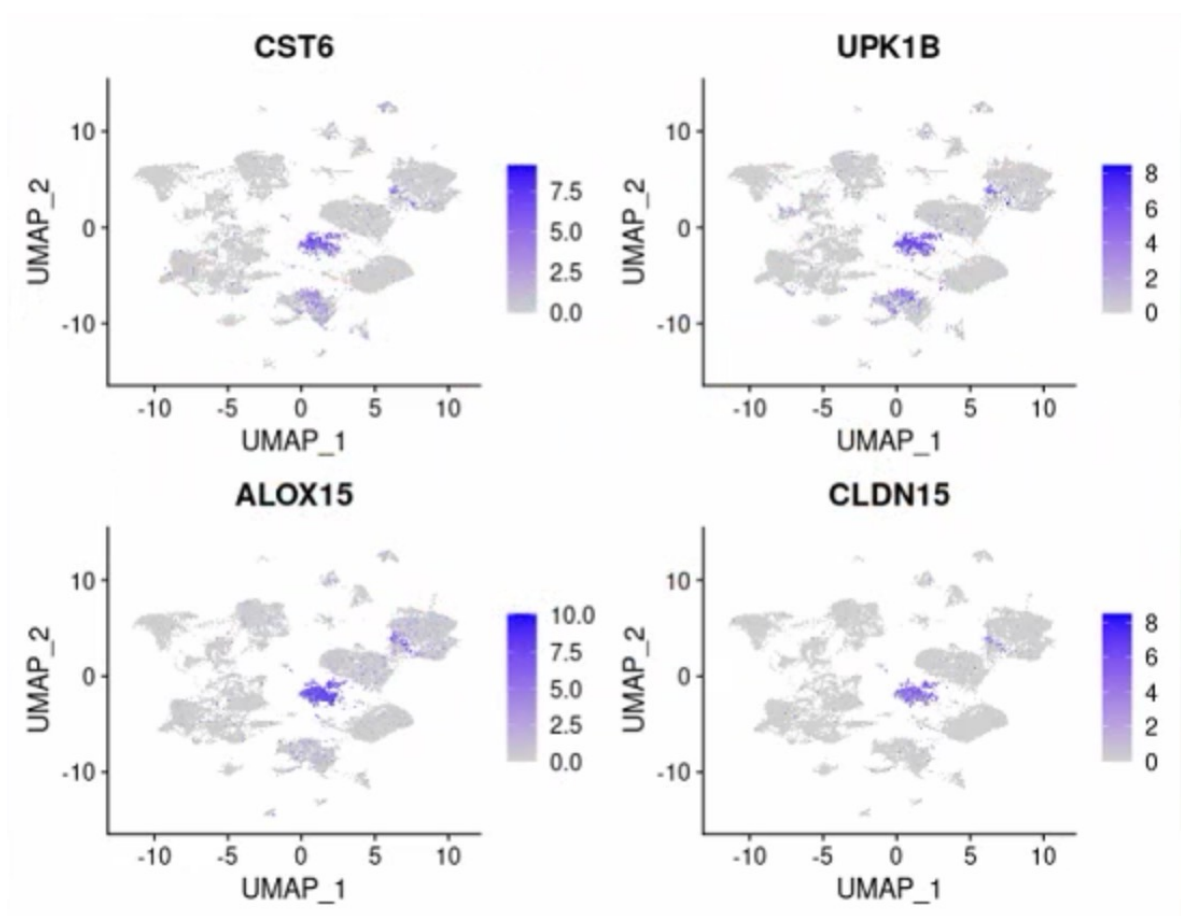


図2 中皮細胞マーカー遺伝子の発現パターン

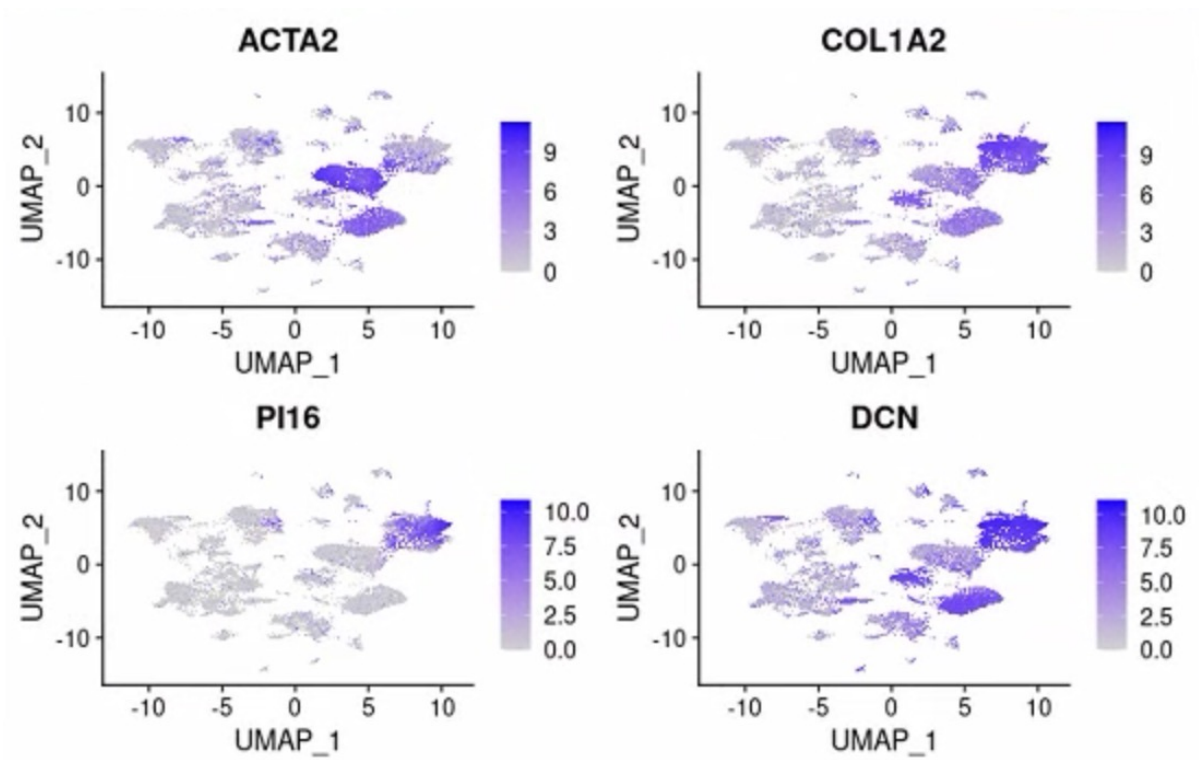


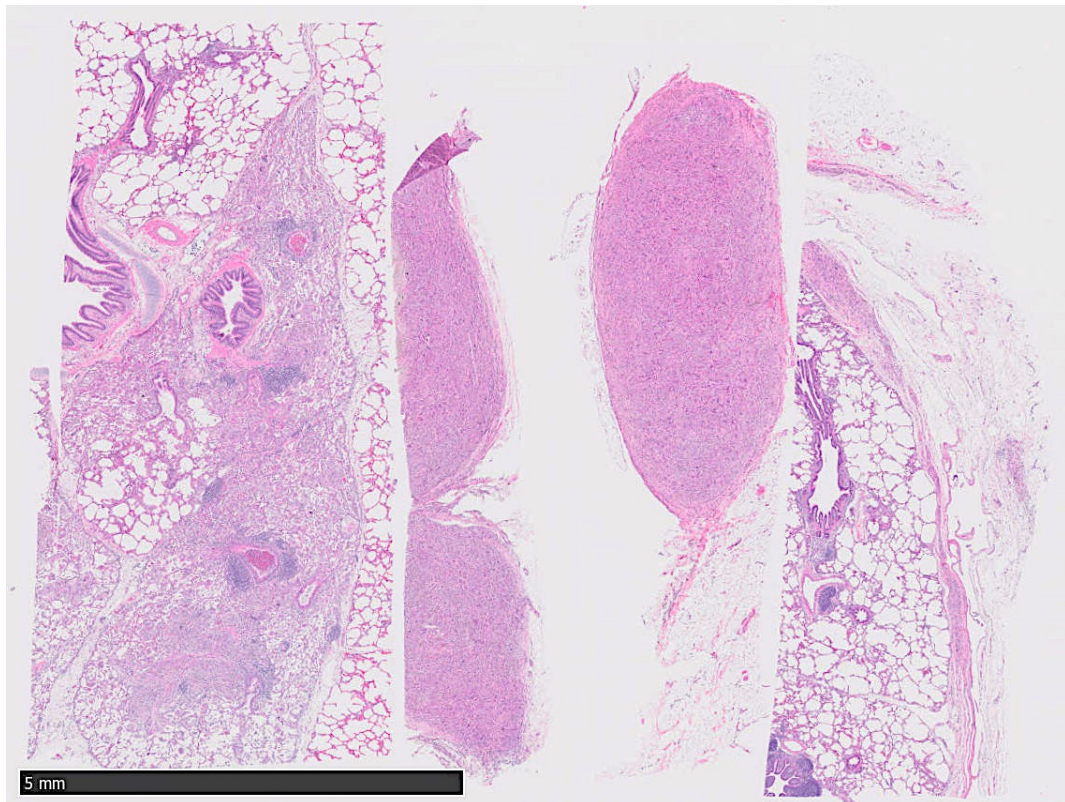
図3 外膜線維芽細胞マーカー遺伝子と線維芽細胞活性化遺伝子の発現パターン

A

肺内病变1

胸膜病变1

胸膜病变2



B

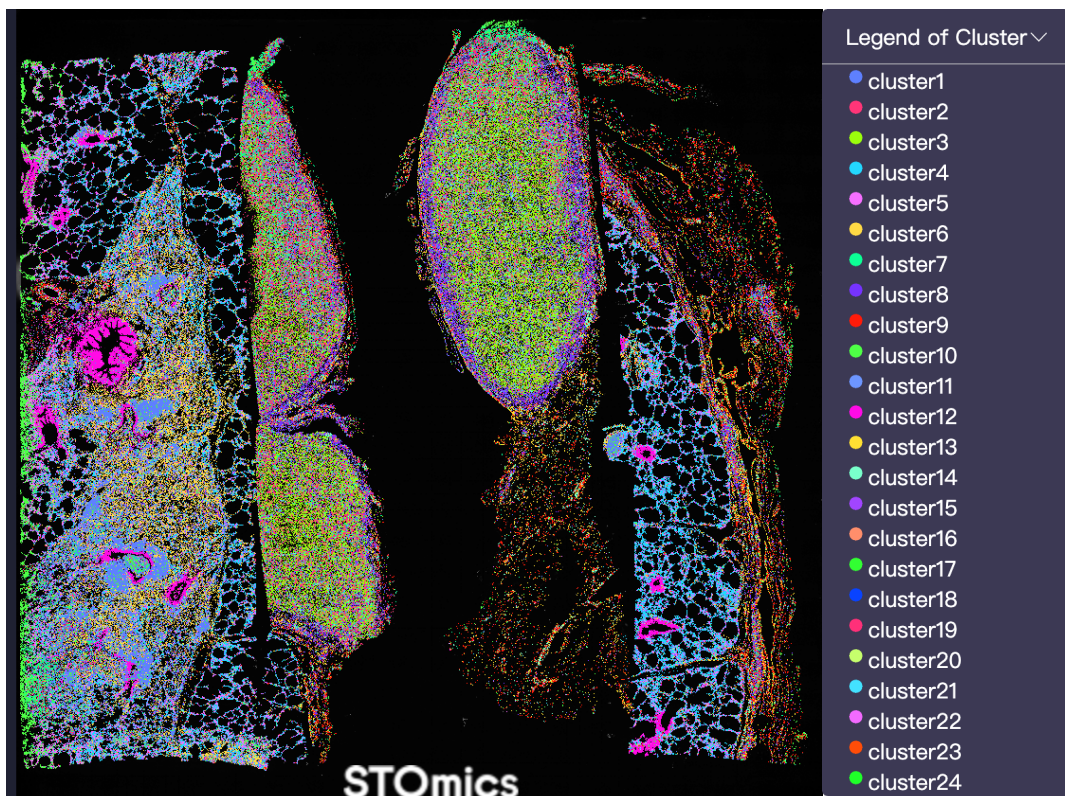


図4 石綿投与ブタ2頭の空間遺伝子発現解析

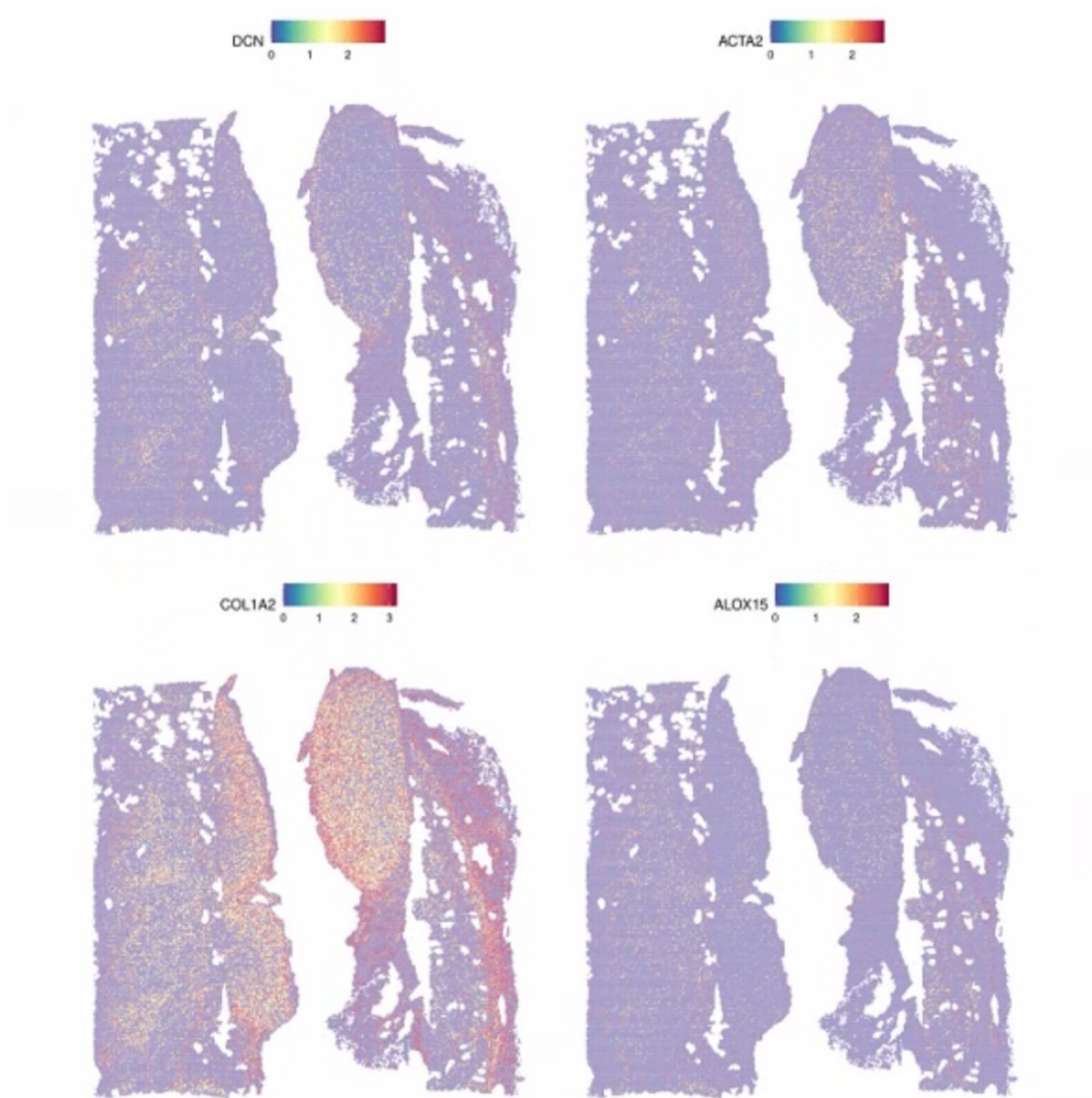


図5 石綿投与ブタの空間遺伝子発現解析
(DCN, ACTA2, COL1A2, ALOX15)

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7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：1細胞 RNA-seq を用いたアスベスト曝露肺・胸膜組織の細胞構成変化と病態関連経路

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、Crocidolite（青石綿）を投与したブタの肺組織を単離し、1細胞レベルでの遺伝子発現の網羅的な解析を実施した。肺内2頭ならびに胸腔内2頭の計4頭の豚の1細胞 RNA-seq データを取得し、細胞の種類の分類ならびに青石綿投与肺と対照群の非投与肺組織の比較解析を目的とした（豚への青石綿の投与については、R6 年度報告書の分担者高須の項を、1細胞 RNA-seq 解析の実施については、R7 年度報告書の分担者七野の項を参照）。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、肺に含まれている細胞種ごとに各クラスターのアノテーションを行った。さらに、それらの分類をもとに、青石綿の投与部位ごとの比較を上皮細胞、免疫細胞、間質細胞ごとに実施した。次に、細胞の種類ごとに、青石綿投与肺と対照群における細胞の割合に違いを比較検討した。それらの結果、胸腔内の上皮において、基底細胞/分泌細胞の分画が青石綿投与群で上昇していることや周皮細胞の割合が、肺内と胸腔内の両方において、上昇していることを見出した。免疫細胞においては細胞の割合に明確な違いは認められなかった。青石綿投与により、大きな影響があるとされている中皮細胞に焦点をあてて、遺伝子発現および活性化経路について解析を行い発がん関連の経路の同定を行った。さらに、石綿肺、びまん性胸膜肥厚が炎症性線維性疾患であることから、PI16 陽性細胞系譜に注目した結果、CTHRC1 陽性 Pathogenic Fibroblast を同定した。

A. 研究目的

ヒトとブタの肺ならびに胸腔組織は形態的に類似していると考えられているが、豚において青石綿投与が及ぼす影響は不明な点が多い。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を行うことで、青石綿が豚の肺ならびに胸腔組織に与える影響について詳細な解析を行うことを目的とする。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、青石綿投与が与える影響について、1細胞レベルでの細胞種の割合の変化ならびに遺伝子経路の解析を行う。

B. 研究方法

豚4頭の青石綿投与の1細胞 RNA-seq 発現解析を実施した。青石綿を肺内（2頭）ならびに胸腔内（2頭）に20 mg/kg BW で投与した。回収された肺組織を酵素処理によって、1細胞化し、1細胞 RNA-seq 解析（TAS-Seq2 法）を実施した（分担者七野の項を参照）。NGS 解析により得られた Raw data（fastq ファイル）を Cell Ranger によって Mapping 後に作成された 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。死細胞除去等の Quality check 後に、UMAP を作成し、次元削減を行った。UMAP 上において得られた

細胞クラスターをもとに、細胞種のマーカー遺伝子の発現パターンを確認した。マーカー遺伝子の発現プロファイルより、細胞の種類の特定を行った。青石綿の投与部位（肺内および胸腔内）、投与の有無（投与群および対照群）において、細胞種ごとの割合の変化について比較検討を実施した。IPA 等のソフトウェアを用いて遺伝子発現解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究で解析した検体はすべて豚を用いた検討であり、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。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、青石綿を投与したブタ肺組織から採取した細胞の1細胞 RNA-seq のデータ解析を実施した。青石綿を投与したブタ肺組織に由来する1細胞 RNA-seq データを UMAP に示した。それぞれのクラスターについて、マーカー遺伝子の発現パターンより、クラスターごとの細胞の種類の同定を行った。その結果、29種類の細胞種を同定することに成功した。上皮、間質、免疫細胞に大別し、投与部位ならびに投与の有無にお

ける細胞の割合の変化を評価した(図1)。その結果として、免疫細胞においては、細胞の割合に大きな違いは認められなかったが、上皮細胞や間質細胞では細胞の割合に変化が認められた。胸腔内の上皮細胞においては、基底細胞/分泌細胞の割合が青石綿投与群で増加していること(投与群: 59.8%; 対照群: 47.2%)やI型肺胞上皮細胞(投与群: 6.7%; 対照群: 17.8%)やII型肺胞上皮細胞(投与群: 13.7%; 対照群: 18.5%)の割合が減少していることを明らかにした。さらに、間質細胞では、周皮細胞の割合が、肺内と胸腔内の両方において、上昇していることを見出した。

肺内においては、中皮細胞はほとんど検出されなかった。肺内投与群: 13細胞、対照群: 10細胞のみが検出された(図2A)。胸腔内投与において、青石綿が最も影響を及ぼすと想定していた中皮細胞の割合が減少していることが確認され、中皮細胞に傷害があることが示唆された。中皮細胞をマーカー遺伝子の発現プロファイルより単離し、中皮細胞のみをUMAPに再プロットした(図2B)。投与群と対照群の比較を行ったところ、中皮細胞のクラスターにおいては明確な違いは認められなかった。そこで、投与群と対照群の中皮細胞の遺伝子発現の比較を行った。444遺伝子が投与群で高発現しており、221遺伝子の発現が減少していた。発現が上昇していた444遺伝子を用いて、パスウェイ解析を行ったところ、図3に示すような経路が統計的に有意に検出された。がんに関連する経路が検出されており、青石綿投与によって、発がんの初期過程が生じていることが示唆された。

さらに、石綿曝露による線維化の分子の実態を解明するため、全4頭の解析データ(約18万細胞)から外膜線維芽細胞系譜の指標であるPI16陽性細胞(計22,945細胞)を抽出し、高解像度な再クラスター解析を実施した。その結果、合計16個の独立したサブセットが同定された(図4, 5)。

いずれのクラスターもEPCAM, PTPRC, CLDN5陰性であり、上皮、免疫細胞、内皮細胞は含まれなかった(図5)。特筆すべきは、クラスター10において、膠原線維(COL1A1, COL3A1)に加え、POSTN(ペリオスチン)やCTHRC1といった、ヒトの肺線維症やがん微小環境で報告されている「Pathogenic Fibroblast(病的線維芽細胞)」特有の遺伝子群が顕著に集積しており、本細胞種が同定された。

D. 考察

1細胞発現解析を行うことで、青石綿の投与場所(肺内および胸腔内)、青石綿の投与群ならびに対照群での細胞集団の違いを評価することができた。さらに、各細胞クラスターの遺伝子発現レベルから細胞ごとに特徴的に発現する遺伝子の発現レベルをもとに細胞の種類を同定し、細胞群ごとに比較検討を行うことに成功した。その結果として、青石綿の投与群に特徴的に変化する細胞集団の同定を実施することに成功した。青石綿投与群と対照群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た。

加えて、本研究で同定されたPI16陽性細胞の動態は、青石綿の投与による組織傷害と連動する炎症性線維性病変の発症機序を説明する上で極めて重要な知見である。先行研究においてPI16陽性細胞は組織傷害時のリザーバー(供給源)として機能する「Universal fibroblast」であることが示唆されているが、本解析により、石綿の慢性的な刺激下において、これら前駆細胞から病的線維芽細胞(クラスター10)への分化誘導が生じている可能性が示唆された。これは、青石綿の吸入より人で生じる石綿肺、びまん性胸膜肥厚等重要な石綿関連疾患に共通する不可逆的な線維化プログラムが本疾患モデルでも開始している可能性を示唆している。齧歯類モデルでは同定が困難であったPI16陽性細胞系譜を、2万細胞を超える規模で高精度に捉えられた点は、ヒトの石綿関連疾患の分子病態を理解するための強力なエビデンスとなる。

E. 結論

4頭の豚から取得された肺の1細胞RNA-seq解析を行うことで青石綿が肺内ならびに胸腔内の細胞に及ぼす影響について解析することができた。中皮細胞クラスターを解析対象とすることで、青石綿が中皮細胞に及ぼす影響について遺伝子発現レベルで明らかにした。PI16陽性細胞系譜の中から、ヒト線維症疾患などで同定されたPathogenic fibroblastと類似する遺伝子シグネチャーを持つ細胞を同定した。さらに、それらのデータをもとに、青石綿投与によって誘導される豚肺組織がヒトの症例と類似している症状、異なっている症状について、令和8年度に取得予定の青石綿投与した肺組織への長期的な影響の詳細な解析を進める。

G. 研究発表

- 論文発表
- 3) Tamura T, Yamamoto T, Kogure A, Yoshioka Y, **Yamamoto Y**, Sakamoto S, Ichikawa T & Ochiya T. Extracellular Vesicles From Prostate Cancer-Corrupted Osteoclasts Drive a Chain Reaction of Inflammatory Osteolysis and Tumour Progression at the Bone Metastatic Site. *Journal of Extracellular Vesicles*, 14(6):e70091. (2025)
- 4) Kuroiwa Y, Doi Y, Nakamichi K, **Yamamoto Y**, Semba K. Gene signatures associated with brain-topical proliferative activity in breast cancer. *BBRC*, 775:152127. (2025)
- 5) Watanabe N, Yoshida M, Hirano Y, Fujimoto S, Matsubayashi S, Ishiguro T, Takahashi N, Shimizu Y, Takayanagi N, Kawabata Y, Mori Y, Okamoto K, Minagawa S, Kuwano K, Araya J, **Yamamoto Y**, Fujita Y. Integrated Spatial and Single-Cell Transcriptomics Reveal PAK kinase as a Therapeutic Target in Fibroblastic Foci and Dense

- Fibrosis of IPF. *European Respiratory Journal*, 66(4):2500022. (2025)
- 6) Ohno H, Nishimura T, Kainoh K, Ohashi Y, Onodera N, Kano M, Sari LN, Masuda M, Tamura Y, Nishino T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Takahashi S, Mishima Y, Yoneyama Y, Takeuchi Y, Sekiya M, Matsuzaka T, Miyamoto T, Shimano H. Label-free imaging of intracellular structures in living mammalian cells via external apodization phase-contrast microscopy. *FEBS J*, 293(4):1127-1149. (2025)
 - 7) Asano-Inami E, Yokoi A, Yoshida K, Taki K, Kitagawa M, Suzuki K, Uekusa R, Nagao Y, Yoshikawa N, Niimi K, Yamamoto Y, Kajiyama H. Proteomic profiling of bacterial extracellular vesicles for exploring ovarian cancer biomarkers. *Journal of Extracellular Biology*, 4(10):e70073. (2025)
 - 8) Suzuki K, Yokoi A, Yoshida K, Suzuki H, Kitagawa M, Asano-Inami E, Matsuo S, Yoshihara M, Tamauchi S, Yoshikawa N, Niimi K, Sudo T, Yamaguchi S, Yamamoto Y, Kajiyama H. Overcoming platinum-resistant ovarian cancer targeting the activated JAK-STAT pathways via extracellular vesicles. *Communications Biology*, 8(1):1305. (2025)
 - 9) Suzuki H, Yoshida K, Yokoi A, Suzuki K, Hirano Y, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yoshihara M, Nagao Y, Tamauchi S, Yoshikawa N, Kajiyama H, Yamamoto Y. Exploring drug resistance via intercellular crosstalk using spatial transcriptomics in high-grade serous ovarian carcinoma. *npj Precision Oncology*, 9(1):345. (2025)
 - 10) Suzuki K, Yamamoto Y, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yoshida K, Kajiyama H, Yokoi A. Differential Proteomics of Large Extracellular Vesicles in Ovarian Cancer. *Proteomics*, e70054. (2025)
 - 11) Yoshida M, Watanabe N, Hirano Y, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y. Reply to: From fibroblast foci to dense scars: PAK2-activated fibroblasts drive fibrosis progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 66(5):2501735. (2025)
 - 12) Shibata M, Yoshida K, Yasui Y, Nishiko Y, Hattori S, Nakamura K, Koya Y, Yamamoto Y, Suzuki K, Yoshihara M, Nagao Y, Tamauchi S, Yokoi A, Yoshikawa N, Nishino K, Yamamoto E, Niimi K, Kajiyama H. Natural-killer-cell-dominant immune landscape and HLA-E-mediated immune evasion in choriocarcinoma. *Placenta*, 174:9-18. (2025)
 - 13) Matsuo S, Yokoi A, Ushida T, Yoshida K, Suzuki H, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yamada H, Miki R, Tano S, Imai K, Nagata I, Yasui T, Yamamoto Y, Kajiyama H, Kotani T. LIMCH1-enriched extracellular vesicles promote vascular permeability in early-onset preeclampsia. *Science Advances*, 12(5):eab8806. (2025)
 - 14) Tamauchi S, Yoshida K, Xinyuan W, Nakagawa A, Yokoi A, Yoshikawa N, Niimi K, Yamamoto Y, Kajiyama H. In-tumor CRISPR-Cas9 knockout screening and novel therapy development for malignant transformation of ovarian teratoma. *Cancer Science*, 117(4):983-995 (2026)
 - 15) Hirano Y, Suzuki H, Nakayama J, Yamamoto T, Hirata E, Araya J, Fujita Y, Yamamoto Y. An Integrated Single-Cell Lung Cancer Atlas Reveals Distinct Fibroblast Phenotypes between Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinomas. *npj Precision Oncology*, 10(1):72. (2026)
 - 16) Hirano Y, Yoshida M, Watanabe N, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y. Reply to: Towards causal validation and clinical translation of the PAK2–fibroblast axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 67(3):2502353. (2026)
 - 17) Tsubaki S, Nashimoto S, Tanaka R, Toyomoto T, Tsutsuki H, Kato K, Nakayama J, Kimura K, Oshima K, Yamamoto Y, Okusaka T, Esaki M, Kawai N, Ota N, Yoshioka Y, Ochiya T, Saito Y, Sawa T, Hozumi K, Matsuzaki J, Tsugawa H. Gut commensal *Klebsiella pneumoniae* extracellular vesicles shape a liver microenvironment conducive to gut-liver bacterial translocation and pro-tumorigenic processes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 15(4):e70262. (2026)
 - 18) Yoshihara K, Urabe F, Umemori M, Suzuki H, Ito K, Yanagisawa T, Sato S, Sekine K, Kimura T, Yamamoto Y. Spatial transcriptomics of en bloc transurethral resection of bladder tumor specimens defines an invasive-front gene expression signature. *npj Precision Oncology*, in press (2026)
2. 学会発表
 - 1) 安岡(明果瑠)いるま, 西田亮一, 山本雄介, 東山繁樹, 中山淳. 乳がん休眠を制御する遺伝子ネットワークの解析. 日本がん転移学会学術集会. 第34回 2025年6月
 - 2) 鈴木 公基, 横井 暁, 吉田 康将, 鈴木 一弘, 北川 雅美, 稲見 恵理, 梶山 広明, 山本 雄介. 高異型度漿液性卵巣癌における薬剤耐性機構を解明するための空間トランスクリプトーム解析. 日本婦人科腫瘍学会. 第67回 2025年7月
 - 3) 吉原健太郎, 吉原健太郎, 占部文彦, 占部文彦, 伊藤景紀, 伊藤景紀, 鈴木公基, 木村高弘, 山本雄介. En bloc TUR 検体を用いた空間トランスクリプトーム解析による膀胱癌の浸潤機構の解明. 日本ヒト細胞学会学術集会 第43回 2025年9月
 - 4) 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. 第45回 2025年9月
 - 5) 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. 第45回 2025年9月

- 6) 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. *Klebsiella pneumoniae* 由来 tsRNA の肝がん発がんに与える影響. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 7) プリエトビラ マルタ, 中山 淳, 薄場 渉, 小島 康幸, 椎野 翔, 吉田 正行, 松崎 潤太郎, 落谷 孝広, 山本 雄介. シングルセル解析による原発腫瘍細胞の稀少サブクローンにおける転移関連遺伝子発現シグネチャ. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 8) 鈴木 公基, 吉田 康将, 横井 暁, 鈴木 一弘, 平野 悠太, 梶山 広明, 山本 雄介. 高悪性度漿液性卵巣癌における細胞間クロストークを介した薬剤耐性を解明するための空間的トランスクリプトーム解析. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 9) 片山 翔太, 仙波 憲太郎, 山本 雄介, 中山 淳. 乳がんにおける HER2 発現の動的変化とその意義の解明. 1 細胞メタ解析による多発性骨髄腫の薬剤耐性機構の解明. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 10) 吉原 健太郎, 占部 文彦, 伊藤 景紀, 鈴木 公基, 小島 勇貴, 高橋 陵宇, 木村 高弘, 山本 雄介. 副腎癌の RNA-seq と exome-seq による病因解明. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 11) 安岡 いるま, 西田 亮一, 山本 雄介, 東山 繁樹, 中山 淳. 乳がんの休眠制御に関わる遺伝子ネットワーク解析. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 12) 武井 祐樹, 林 祐介, 東 和志, 仙波 憲太郎, 山本 雄介. E-cadherin の点変異や核局在がもたらす entosis への影響. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月
- 13) 都倉 桃子, 中山 淳, 鈴木 公基, 高山 伸, 吉田 正行, 山本 雄介. 空間トランスクリプトーム解析による古典型浸潤性小葉がん和多形型浸潤性小葉がんの分子生物学的特徴の比較. 日本癌学会総会. 第 84 回 2025 年 9 月

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

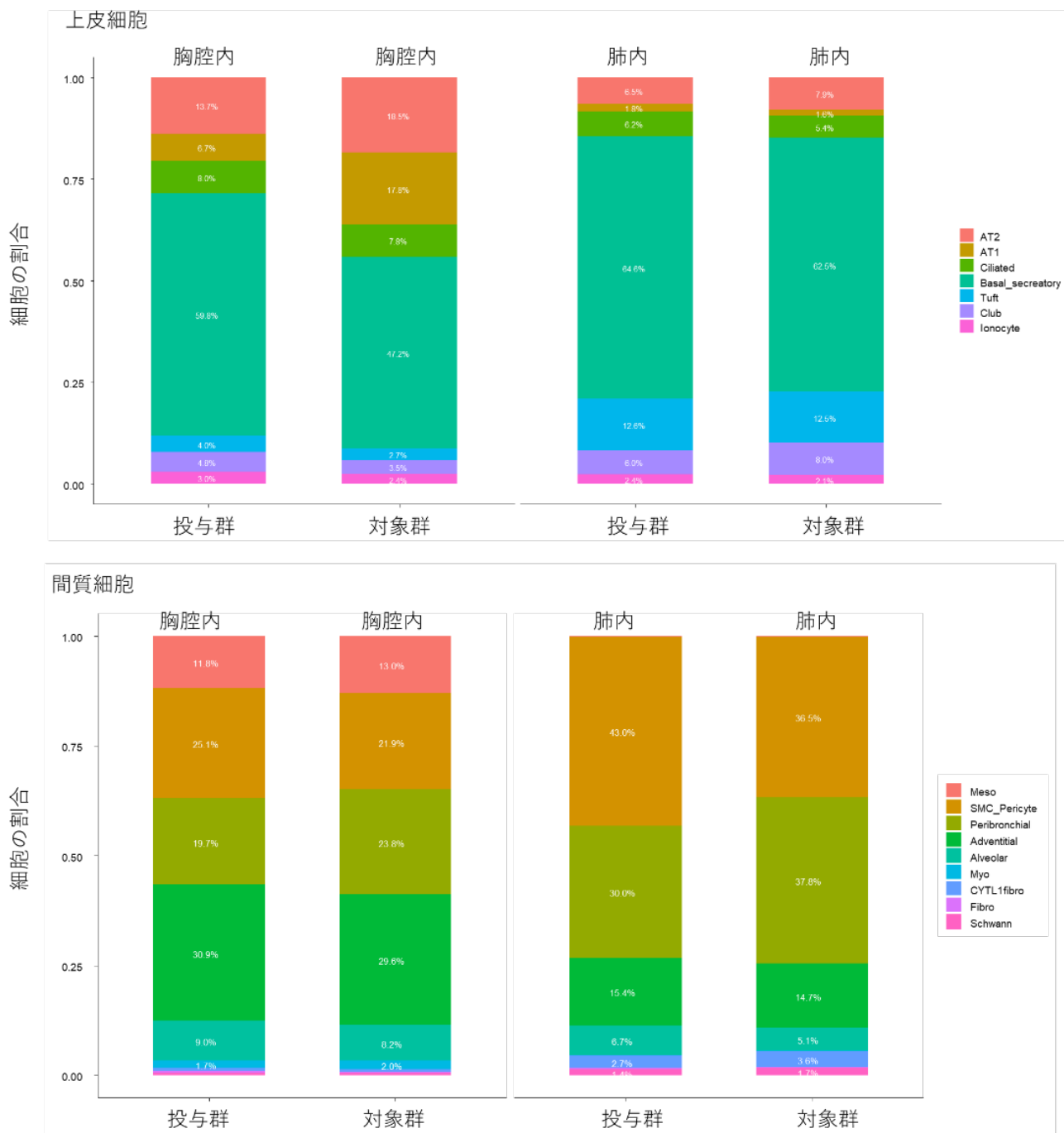


図1 青石綿投与による細胞集団の割合の変化

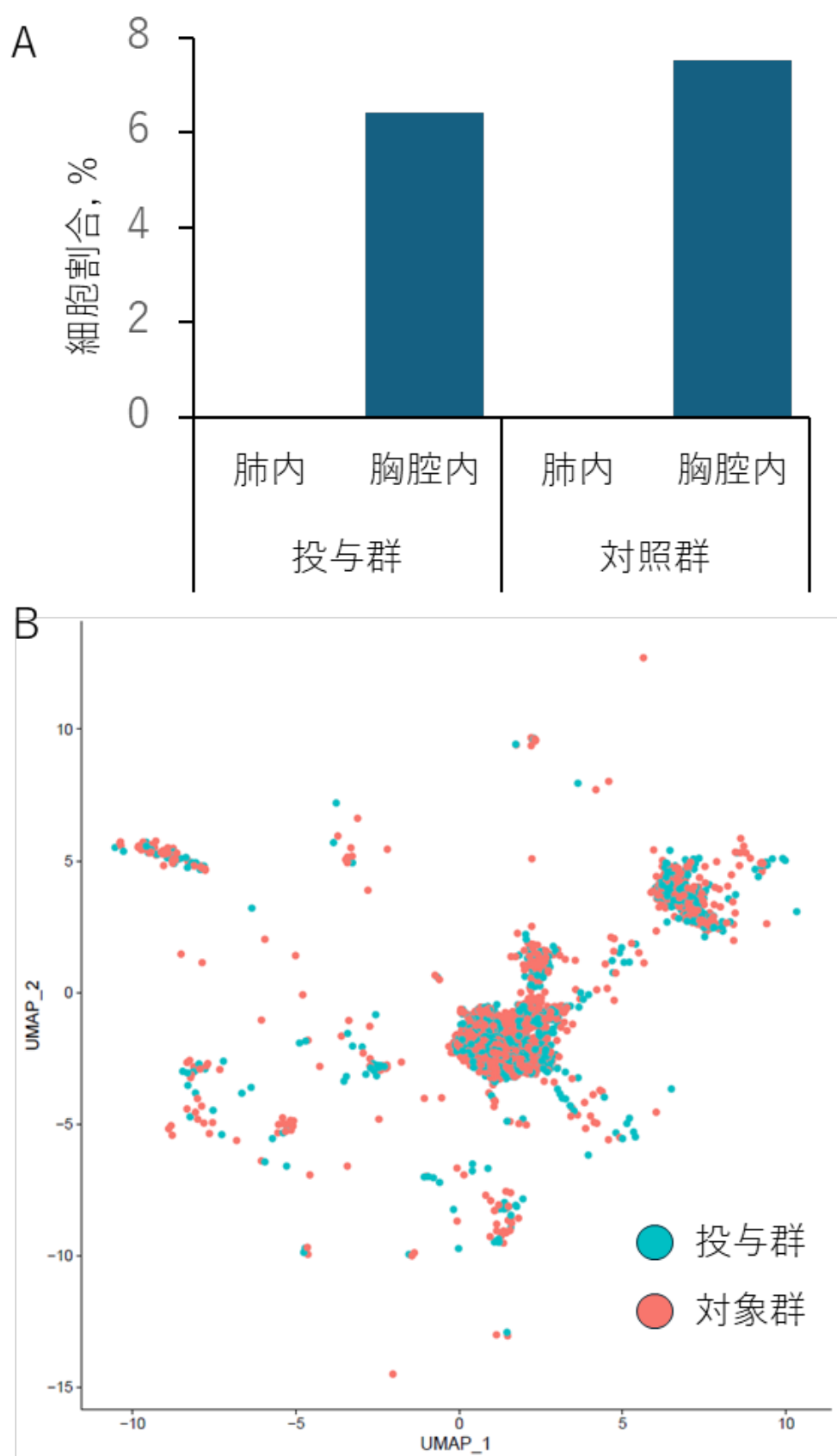


図2 青石綿投与・対照群の中皮細胞の割合

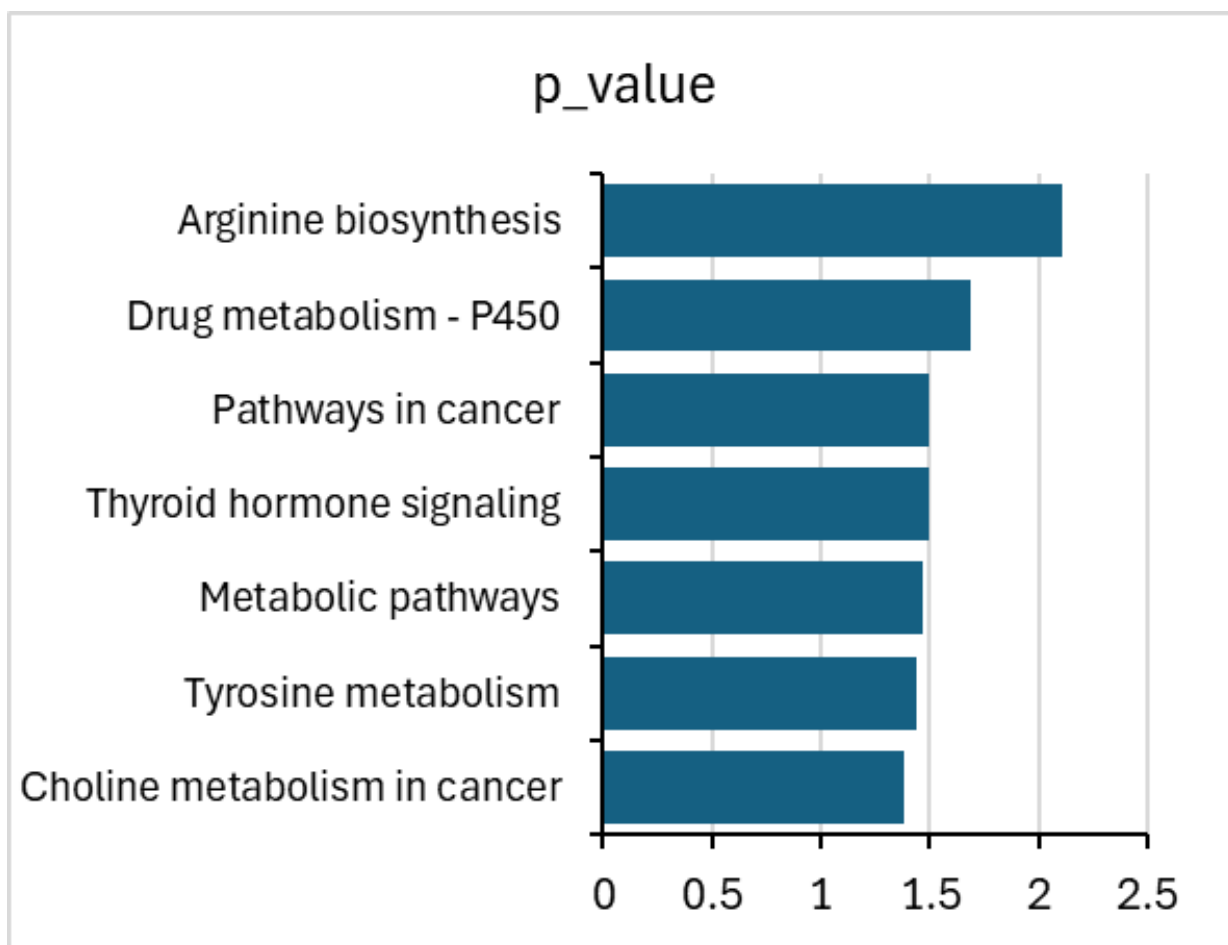


図3 青石綿投与による中皮細胞内のパスウェイ解析

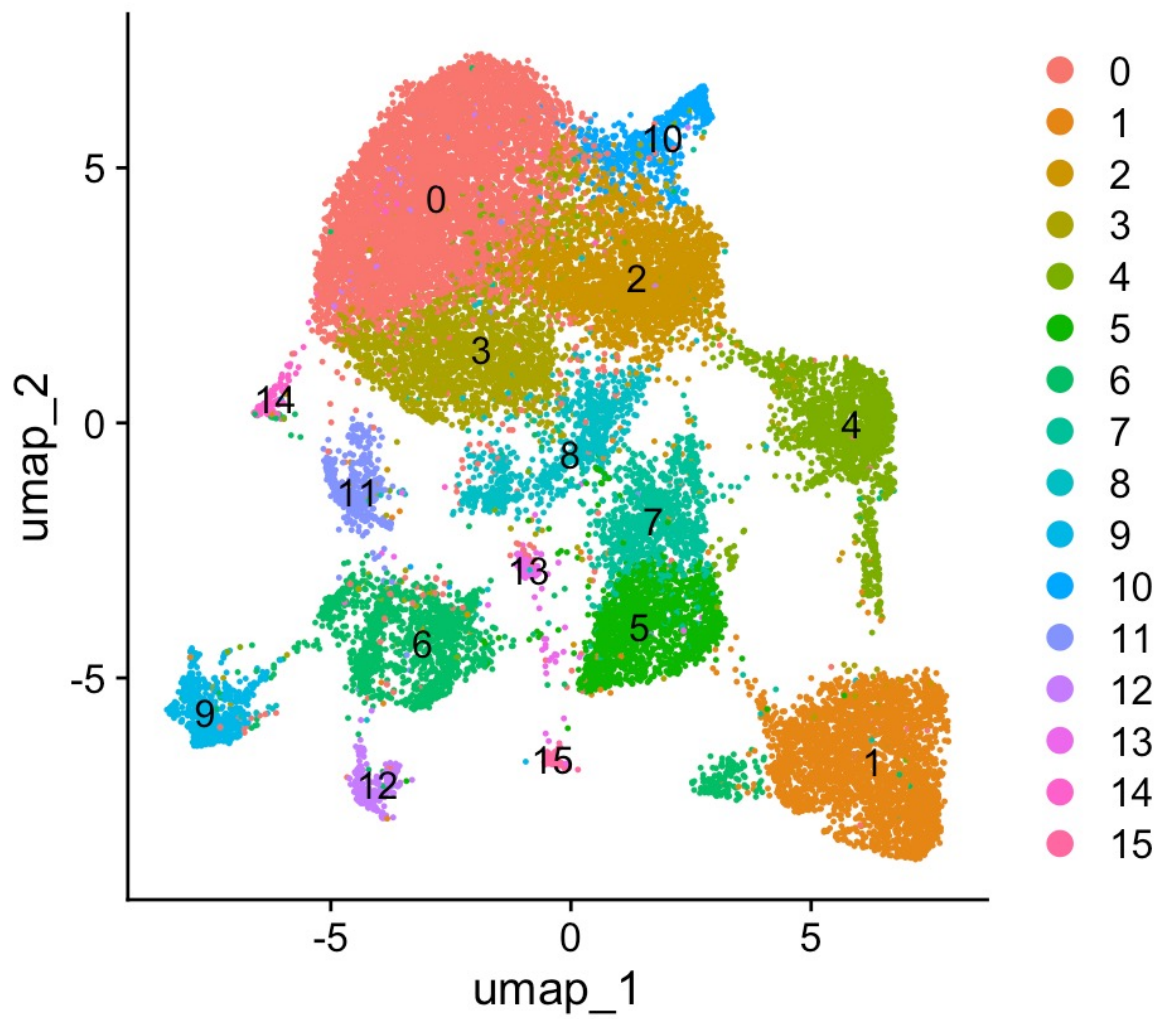


図4 PI16陽性細胞のみでのサブクラスター解析

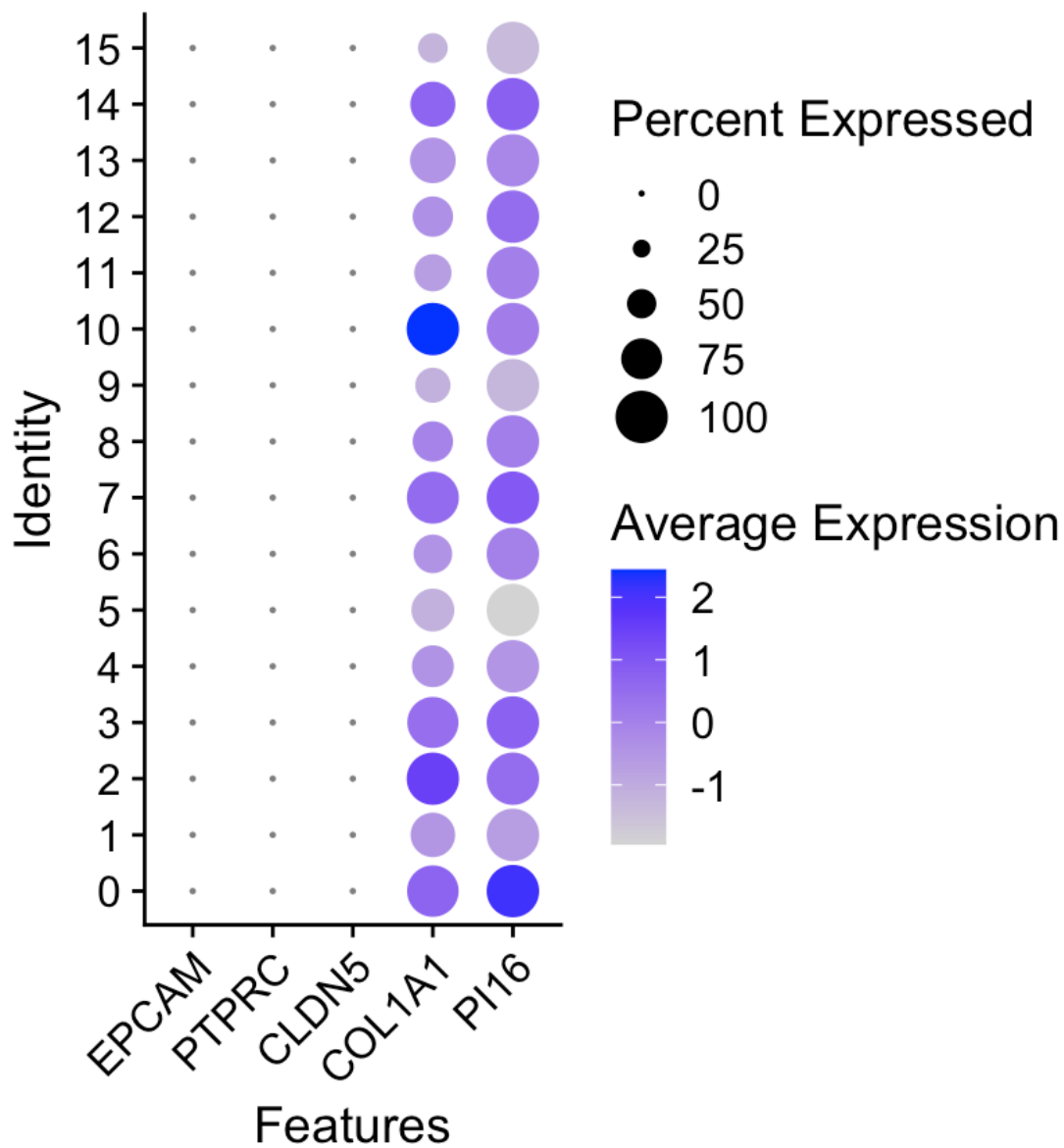


図5 PI16陽性細胞16クラスターのマーカー発現

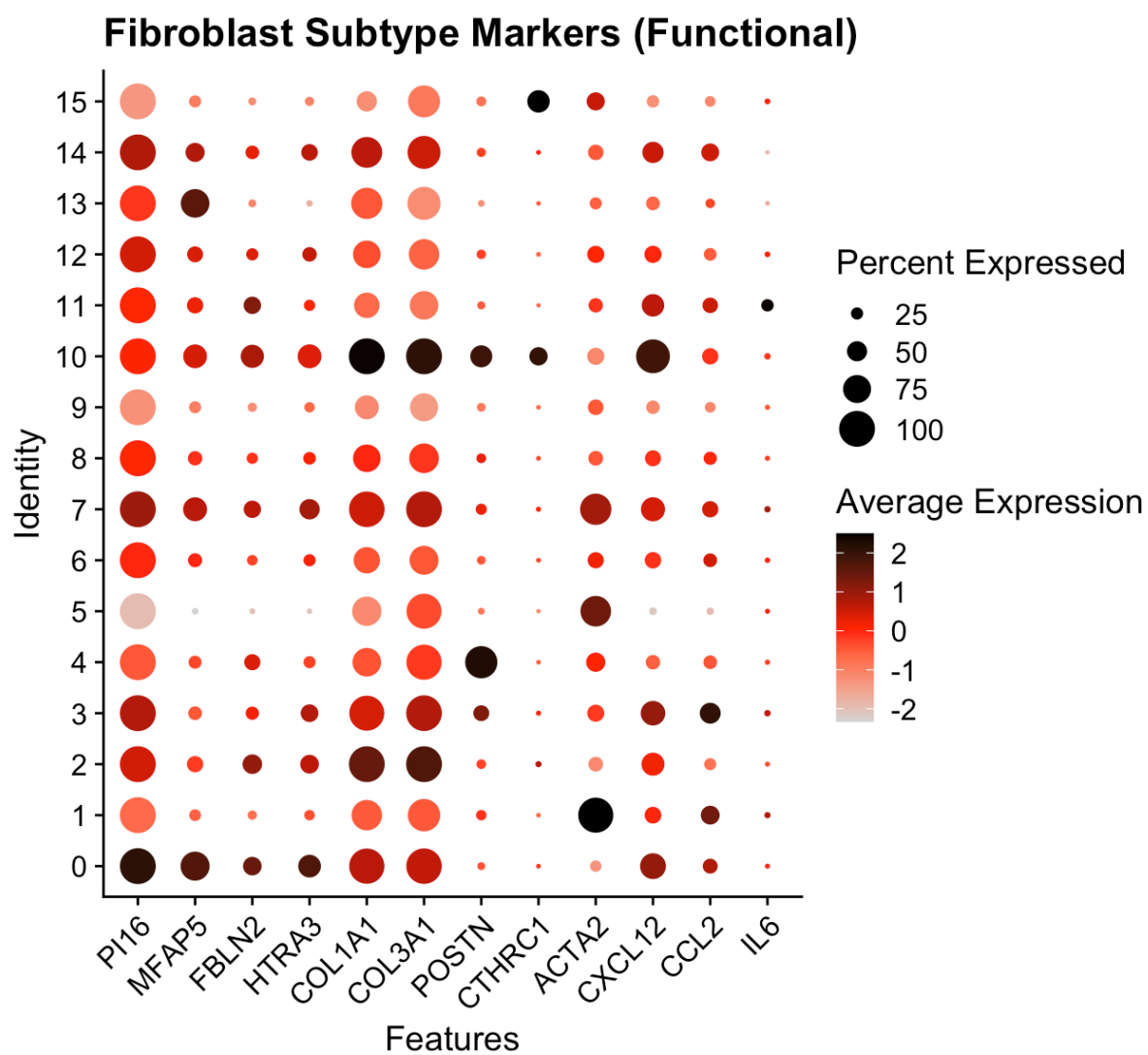


図6 16クラスターにおけるPathogenic Fibroblast マーカーの発現

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doi S, Kobayashi Y, Takashima S, Ide W, Murahata Y, Yayota M, Takasu M, Sassa-O'Brien Y, Shibata S.	Comparison of serum paraoxonase 1, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase activities among dogs, cats, micro-mini pigs, and goats.	J Vet Med Sci	-	-	2026
Miyake T, Kawano Y, Kashihara T, Takasu M, Takagaki K, Fujimoto S, Kawaguchi T, Kagemoto K, Kida Y, Okamoto K, Sogabe M, Muguruma N, Tsuneyama K, Sato Y, Takayama T.	Orthotopic Esophageal Cancer Xenograft Model in Immunosuppressed Microminipigs for Near-Infrared Fluorescence Endoscopy.	Cancer Sci	-	-	2026
Ohki T, Miyawaki S, Higa T, Yamazaki H, Okaki H, Nakajima R, Kitamura K, Nakagawa MG, Sanosaka T, Tsugawa H, Honda K, Hirata A, Goto T, Handa M, Tokutake K, Saeki S, Yamamoto M, Watanabe K, Maeda S, Takasu M, Sugiura Y, Takiuchi T, Kohyama J, Suematsu M, Hirata H.	Identification of endometrial CD169+ macrophages essential for Treg cell accumulation and implantation.	Cell Rep	45(3)	117040	2026
Umemura A, Takasu M.	Sense-Science-Significance Model: A Museum Education Framework for Engaging Visitors with Cultural Heritage.	Journal of Museum Education	-	1-13	2026

Yamano S, Schaudien D, Umeda Y.	The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles.	Nanomaterials	16(4)	230	2026
Tamauchi S, Yoshida K, Xinyuan W, Nakagawa A, Yokoi A, Yoshikawa N, Niimi K, Yamamoto Y, Kajiyama H.	In-tumor CRISPR-Cas9 knockout screening and novel therapy development for malignant transformation of ovarian teratoma.	Cancer Science	117(4)	983-995	2026
Hirano Y, Suzuki H, Nakayama J, Yamamoto T, Hirata E, Araya J, Fujita Y, Yamamoto Y.	An Integrated Single-Cell Lung Cancer Atlas Reveals Distinct Fibroblast Phenotypes between Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinomas.	npj Precision Oncology	10(1)	72	2026
Hirano Y, Yoshida M, Watanabe N, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y.	Reply to: Towards causal validation and clinical translation of the PAK2–fibroblast axis in idiopathic pulmonary fibrosis.	European Respiratory Journal	67(3)	2502353	2026
Tsubaki S, Nashimoto S, Tanaka R, Toyomoto T, Tsutsuki H, Kato K, Nakayama J, Kimura K, Oshima K, Yamamoto Y, Okusaka T, Esaki M, Kawai N, Ota N, Yoshioka Y, Ochiya T, Saito Y, Sawa T, Hozumi K, Matsuzaki J, Tsugawa H.	Gut commensal Klebsiella pneumoniae extracellular vesicles shape a liver microenvironment.	Journal of Extracellular Vesicles	15(4)	e70262	2026
Yoshihara K, Urabe F, Umemori M, Suzuki H, Ito K, Yanagisawa T, Sato S, Sekine K, Kimura T, Yamamoto Y.	Spatial transcriptomics of en bloc transurethral resection of bladder tumor specimens.	npj Precision Oncology	in press	-	2026
Thaw P, Hano K, Saito I, Kanda T, Kitagawa H, Takasu M.	Establishment of a step-down FSH superovulation protocol in microminipigs.	In Vivo	40	89-98	2026

Yoshihara T, Tozaki T, Kawate K, Furukawa R, Kikuchi M, Ishige T, Kakoi H, Takasu M, Hobo S.	SNP array-based genomic inbreeding and relatedness analyses in Taishu horse.	Livestock Sci	304	105898	2026
Xu P, Ueha S, Aoki H, Kitabatake M, Chen M, Shichino S, Hara A, Ouji-Sageshima N, Ito T, Motozono C, Matsushima K.	Repeated mRNA vaccination and breakthrough infection reveal durable dominance but diminishing recall of vaccine-induced CD8 ⁺ T-cell clones.	International Immunology	-	dxag004	2026
Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T.	Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with <i>Coniothyrium fuckelii</i> .	Sci Rep	16(1)	1507	2025
Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K.	Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation.	Inflamm Regen	45(1)	33	2025
Takahashi M, Tsunoda M, Aoki H, Kurosu M, Ogiwara H, Shichino S, Bending D, Ishikawa S, Thaventhiran JED, Matsushima K, Ueha S.	A pan-immunotherapy signature to predict intratumoral CD8 ⁺ T cell expansions.	Nat Commun	16(1)	9175	2025
Shirai Y, et al. (Kumanogoh A)	Serum vesicle biomarkers reflect the disease activity of idiopathic pulmonary fibrosis.	J Trans Med	23(1)	1102	2025
Matsumoto N, Ueha S, Ueha R, Koyama M, Yamakawa K, Sato T, Goto T, Kono T, Shichino S, Matsushima K, Kondo K.	HPV6-Induced Gene Expression Signature in Recurrent Respiratory Papillomatosis.	Laryngoscope	135(10)	3732-3739	2025
Zong C, et al. (Ichihara G)	Acrylamide-induced noradrenergic axon degeneration is promoted via a non-cell autonomous mechanism.	J Hazard Mater	496	139125	2025

Niitsu T, Kataoka T, Fukushima K, Motooka D, Shichino S, Natsume-Kitatani Y, Kitamura H, Niwa T, Baba T, Okuzaki D, Kumanogoh A, Akira S, Okudela K, Ogura T.	Spatial transcriptomics identifies SPARC as a prognostic marker in interstitial lung diseases.	J Pathol	267(1)	79-91	2025
Matsui H, Nagamachi A, Koizumi M, Kudo R, Ajiro M, Harada H, Harada Y, Shichino S, Yoshimi A.	Genotype-integrated single-cell transcriptome analysis reveals the role of DDX41 pR525H.	Sci Rep	15(1)	22849	2025
Enomoto T, et al. (Kumanogoh A)	Serum C-C motif chemokine ligand 17 as a predictive biomarker for ILD.	Respir Res	26(1)	157	2025
Kohda H, et al. (Suganami T)	Novel cell-to-cell communications between macrophages and fibroblasts regulate obesity-induced adipose tissue fibrosis.	Diabetes	74(7)	1135-1152	2025
Qiu Y, Tang XX, Shichino S, Kushwaha PP, Sanders YY, Russo RC, Mo C.	Editorial: Cellular and molecular mechanisms of lung regeneration, repair, and fibrosis.	Front Cell Dev Biol	13	1653034	2025
Tamura T, Yamamoto T, Kogure A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Sakamoto S, Ichikawa T, Ochiya T.	Extracellular Vesicles From Prostate Cancer-Corrupted Osteoclasts.	Journal of Extracellular Vesicles	14(6)	e70091	2025
Kuroiwa Y, Doi Y, Nakamichi K, Yamamoto Y, Semba K.	Gene signatures associated with brain-topical proliferative activity in breast cancer.	BBRC	775	152127	2025
Watanabe N, et al. (Fujita Y)	Integrated Spatial and Single-Cell Transcriptomics Reveal PAK kinase as a Therapeutic Target.	European Respiratory Journal	66(4)	2500022	2025

Ohno H, et al. (Shimano H)	Label-free imaging of intracellular structures in living mammalian cells.	FEBS J	293(4)	1127-1149	2025
Asano-Inami E, et al. (Kajiyama H)	Proteomic profiling of bacterial extracellular vesicles for exploring ovarian cancer biomarkers.	Journal of Extracellular Biology	4(10)	e70073	2025
Suzuki K, et al. (Kajiyama H)	Overcoming platinum-resistant ovarian cancer targeting the activated JAK-STAT pathways.	Communications Biology	8(1)	1305	2025
Suzuki H, et al. (Yamamoto Y)	Exploring drug resistance via intercellular crosstalk using spatial transcriptomics.	npj Precision Oncology	9(1)	345	2025
Suzuki K, Yamamoto Y, Kitagawa M, Asano-Inami E, Yoshida K, Kajiyama H, Yokoi A.	Differential Proteomics of Large Extracellular Vesicles in Ovarian Cancer.	Proteomics	-	e70054	2025
Yoshida M, Watanabe N, Hirano Y, Araya J, Yamamoto Y, Fujita Y.	Reply to: From fibroblast foci to dense scars.	European Respiratory Journal	66(5)	2501735	2025
Shibata M, et al. (Kajiyama H)	Natural-killer-cell-dominant immune landscape and HLA-E-mediated immune evasion.	Placenta	174	9-18	2025
Matsuo S, et al. (Kotani T)	LIMCH1-enriched extracellular vesicles promote vascular permeability.	Science Advances	12(5)	eaeb8806	2025
Yamano S, Umeda Y.	Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats.	Part Fibre Toxicol	22(1)	7	2025
Umeda Y, et al. (Yamano S)	Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals.	J Toxicol Pathol	38(2)	113-129	2025

Yoshihara T, et al. (Hobo S)	Genetic characterization of phenotypic traits in endangered Taishu horse breed.	Equine Vet J	144	105233	2025
Hisaeda K, et al. (Kitagawa H)	Differences in serum iron concentrations between the summer and winter in Noma horses.	J Equine Sci	36	1-9	2025
Izumi M, et al. (Takasu M)	Glucose and insulin responses following streptozotocin administration in microminipigs.	J Vet Med Sci	87	1122-1127	2025
Hagiwara H, et al. (Aoyama T)	Visualizing ambiguity in semantic segmentation of ICSI support systems.	SICE JCMSI	18	2548044	2025
Ohki T, Kitamura K, Tokutake K, Saeki S, Yamamoto M, Takasu M, Hirata H.	Depletion of CD169 ⁺ Border-Associated Macrophages Induces Parkinson's disease-Like Behavior.	Front Neurosci	19	1688394	2025