

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：82736

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08556

研究課題名(和文)新規シングルセル解析法を用いたじん肺発症-進展における包括的基盤研究

研究課題名(英文)Comprehensive Fundamental Research on the Onset and Development of Pneumoconiosis Using TAS-Seq

研究代表者

山野 荘太郎 (Yamano, Shotaro)

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター(試験管理部、病理検査部)・その他部局等・室長補佐

研究者番号：80614528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：じん肺リスク物質の同定及びその発症機序の解明と迅速かつ効率的な短期評価法の開発を有機的に進める事は喫緊の課題であり、推進すべき重要な研究課題である。そこで本研究では、ラットに Silica または SITO を投与する事でラットじん肺を作成し、TAS-Seq 解析を実施することで、じん肺の1細胞解像度での病態解析を実施した。その結果、じん肺を構成する特徴的な新規細胞群の同定に成功した。今後、これらの細胞群の機能や制御様式を明らかにする事により、労働安全衛生に資するじん肺の基盤的な研究が加速する事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究開発が遅れている職業性呼吸器疾患の病態解明に対して、疾患の発症・進展に重要な役割を担う可能性のある新規細胞種を同定することができ、学術的意義の高い成果が得られた。加えて、これらの特徴的な細胞に対して介入方法を将来検討できるようになり、職業性肺疾患罹患者の予防、治療等に資する基盤的成果が提供できた。

研究成果の概要(英文)：The identification of pneumoconiosis risk substances and the elucidation of their pathogenic mechanisms and the development of rapid and efficient short-term evaluation methods in an organic manner are urgent issues and important research subjects to be promoted. Therefore, in this study, we generated rat pneumoconiosis by injecting Silica or SITO into rats and performed TAS-Seq analysis to analyze the pathogenesis of pneumoconiosis at a single-cell resolution. As a result, we succeeded in identifying characteristic new cell subsets that constitute pneumoconiosis onset and progression. The clarification of the functions and regulatory mechanisms of these cell groups is expected to accelerate fundamental research on pneumoconiosis that will contribute to occupational safety and health in the future.

研究分野：呼吸器

キーワード：じん肺 シングルセル解析 scRNAseq インジウム SITO シリカ RCS 職業性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

職業性肺疾患は、労働作業中に有害な粉じんや環境汚染物質などを吸入する事で生じる呼吸器疾患の総称である。じん肺は「粉じんを吸入する事で肺に生じた線維増殖性変化を主体とする疾病」と定義される日本で最大の職業性肺疾患であり、概してアスベスト等に代表されるように肺線維症のみならず肺がん等の腫瘍性病変を誘発する粉じんが多数存在する。加えて近年ナノマテリアル等新素材の開発が加速しており、毒性面が懸念されるじん肺リスク物質は急速に増加している。しかし、「じん肺の発症-進展機序」に関する研究は原因が明確にも関わらず他の呼吸器疾患と比較して大きく遅れをとっており、国内外を問わず十分に進んでいないのが現状である。以上よりじん肺リスク物質の同定及びその発症機序の解明と迅速かつ効率的な短期評価法の開発を有機的に進める事は喫緊の課題であり、推進すべき重要な研究課題である。我々の研究施設では齧歯類を用いた長期全身吸入曝露試験を行っており、世界に先駆けて肺線維症及び肺腺がんを誘発するじん肺リスク物質を同定した(酸化インジウムスズ, Nagano K *et al*: J Occup Health. 2011, 多層カーボンナノチューブ, Kasai T *et al*: Part Fibre Toxicol. 2016)。これらの経時的な病理評価より種々の粉じんには病変の起きやすいホットスポットがあり、同部位で粉じんを貪食したマクロファージと肺胞上皮前駆細胞の増加がじん肺発症の基点となる所見を得た。以上の知見を元に申請者は「じん肺発症早期において、申請者が同定した起点細胞群がその他肺内細胞群との細胞間コミュニケーションの異常を介してじん肺微小環境を形成し、不可逆的な肺線維化、さらに肺がんへと進展するのではないか」との作業仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「我々が見出した起点細胞群を基軸とし、新たなじん肺発症機構を明らかにすること」であり、これにより「じん肺の短期リスク物質評価法の開発に加え実臨床における早期診断法及び発症予防法の開発に貢献すること」を最終目標とする。

## 3. 研究の方法

F344 ラットを用いて結晶質シリカ (Min-U-Sil 15) (以後 Silica) 及び酸化インジウムスズ板を切削して作成した破片粒子 (以後 SITO) を単回気管内投与した。Silica 及び SITO の投与濃度は、20 mg/rat 及び 10 mg/rat とした。単回投与後、4w、26w、52w にそれぞれ解剖を実施し、肺の病態解析を実施した。シングルセル RNAseq 解析 (scRNAseq) については、26w サンプルを用いて実施した。scRNAseq では、東京理科大学七野成之助教、及び松島綱治教授らの研究チームによって開発された新規高感度 1 細胞解析技術である、TAS-Seq 法 (<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03536-0>) を用いた。

## 4. 研究成果

シングルセル解析を進めた。溶媒対称群 3 匹、Silica 投与群 3 匹、SITO 投与群 3 匹の合計 9 匹より品質チェックを通過した合計 30972 細胞についてシーケンシングした。UMAP を用いて次元削減図を作成した結果、合計 43 クラスタが同定され、大部分は Ptprc 陽性免疫細胞であった。肺胞上皮に着目し、再解析した結果、合計 7 つのクラスタが同定され、そのうち 6 つは Sftpc/Abca3 陽性の肺胞 2 型上皮であり、1 つは Pdpn/Ager 陽性肺胞 1 型上皮であった。じん肺群では、対照群と比較して 1 つのクラスタがドミナントに存在しており、これらの結果からラットじん肺特異的な肺胞上皮が存在する事

が明らかとなった。また pDC を除く DC/Mo/Mac について、再解析を実施した結果、17種類のクラスターが同定された。これらの中で、Silica/SITO に共通して増加したクラスターが7種類同定され、Silica 特異的に増加したクラスター2種類、SITO 特異的に増加したクラスターが1種類同定された。これら増加したクラスターについて、既知の論文で発見された細胞種との比較を行った結果、そのほとんどが Monocyte-Derived Macrophage (以下 MDM) であった。SITO 投与群では、pparg+ Residential Alveolar Macrophage (RAM) のクラスターが消失した事も特徴であった。現在は、これらの細胞を中心に GO 解析などを進めるとともに、特異的な発現分子の同定、及び分子の IHC により、各種解剖期における時空間的局在と機能をさらに検討中である。さらに、今後細胞-細胞連関を検討するために、CCI 解析を実施する。以上今回の研究成果より、じん肺を構成する特徴的な新規細胞群の同定に成功した。今後、これらの細胞群の機能や制御様式を明らかにする事により、労働安全衛生に資するじん肺の基盤的な研究が加速する事が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takeda Tomoki, Yamano Shotaro, Goto Yuko, Hirai Shigeyuki, Furukawa Yusuke, Kikuchi Yoshinori, Misumi Kyohei, Suzuki Masaaki, Takanobu Kenji, Senoh Hideki, Saito Misae, Kondo Hitomi, Daghlian George, Hong Young-Kwon, Yoshimatsu Yasuhiro, Hirashima Masanori, Kobashi Yoichiro, Okamoto Kenzo, Kishimoto Takumi, Umeda Yumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Dose-response relationship of pulmonary disorders by inhalation exposure to cross-linked water-soluble acrylic acid polymers in F344 rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Particle and Fibre Toxicology	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-022-00475-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akter Eilma, Tasaki Yukihiro, Mori Yusuke, Nakai Kazuki, Hachiya Kazuki, Lin Hancheng, Konno Masamitsu, Kamasaki Tomoko, Tanabe Kenji, Umeda Yumi, Yamano Shotaro, Fujita Yasuyuki, Kon Shunsuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111292 ~ 111292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamano Shotaro, Takeda Tomoki, Goto Yuko, Hirai Shigeyuki, Furukawa Yusuke, Kikuchi Yoshinori, Kasai Tatsuya, Misumi Kyohei, Suzuki Masaaki, Takanobu Kenji, Senoh Hideki, Saito Misae, Kondo Hitomi, Umeda Yumi	4. 巻 12
2. 論文標題 No evidence for carcinogenicity of titanium dioxide nanoparticles in 26-week inhalation study in rasH2 mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19139-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamano Shotaro, Goto Yuko, Takeda Tomoki, Hirai Shigeyuki, Furukawa Yusuke, Kikuchi Yoshinori, Kasai Tatsuya, Misumi Kyohei, Suzuki Masaaki, Takanobu Kenji, Senoh Hideki, Saito Misae, Kondo Hitomi, Umeda Yumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Pulmonary dust foci as rat pneumoconiosis lesion induced by titanium dioxide nanoparticles in 13-week inhalation study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Particle and Fibre Toxicology	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-022-00498-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto Yuko, Saito Arata, Takanobu Kenji, Senoh Hideki, Saito Misae, Umeda Yumi, Yamano Shotaro	4. 巻 13
2. 論文標題 Carcinogenicity and testicular toxicity of 2-bromopropane in a 26-week inhalation study using the rash2 mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28825-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamano Shotaro, Takeda Tomoki, Goto Yuko, Hirai Shigeyuki, Furukawa Yusuke, Kikuchi Yoshinori, Misumi Kyohei, Suzuki Masaaki, Takanobu Kenji, Senoh Hideki, Saito Misae, Kondo Hitomi, Kobashi Yoichiro, Okamoto Kenzo, Kishimoto Takumi, Umeda Yumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Mechanisms of pulmonary disease in F344 rats after workplace-relevant inhalation exposure to cross-linked water-soluble acrylic acid polymers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-023-02355-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	杉原 英志  (sugihara eiji)  (50464996)	藤田医科大学・オープンファシリティセンター・准教授    (33916)	
研究 分 担 者	七野 成之  (shichino shigeyuki)  (70822435)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教    (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関