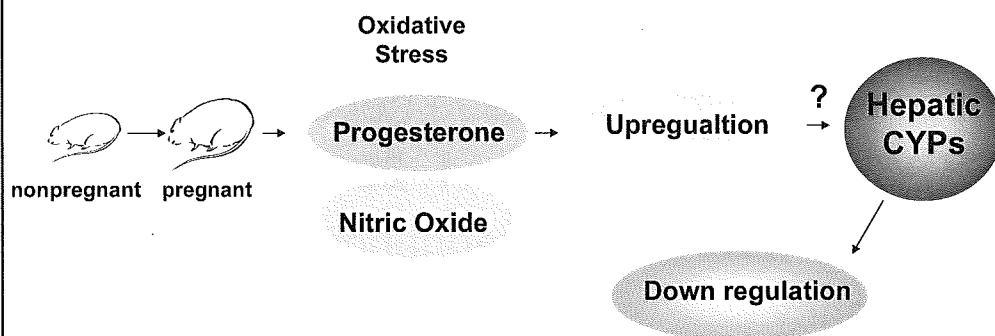
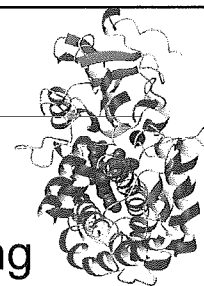


3. Decreases in CYPs may be due to increased oxidative stress, nitric oxide or progesterone during pregnancy.



Introduction

CYP isozymes (CYPs) are a widespread family of heme-containing monooxygenases. Expression of CYPs is known to be influenced by a variety of endogenous and foreign factors such as inflammation, age, gender, nutritional status, pregnancy and chemical exposure.



A body of evidence suggests that pregnancy may be responsible for the reduction in the total content of CYPs in the rat liver. We previously demonstrated that pregnancy is associated with decreased hepatic levels of 6 CYPs proteins (CYP1A1, 2B1, 2B2, 2C6, 2E1 and 4A1) in mid-pregnancy and/or late pregnancy.

After delivery physiological state has been altered, which mostly differ from pregnancy, such as control of prolactin production and maintenance of milk secretion. It was therefore of interest to investigate whether the new physiological state could influence the expression of hepatic CYPs, especially those down-regulated during pregnancy.

Materials

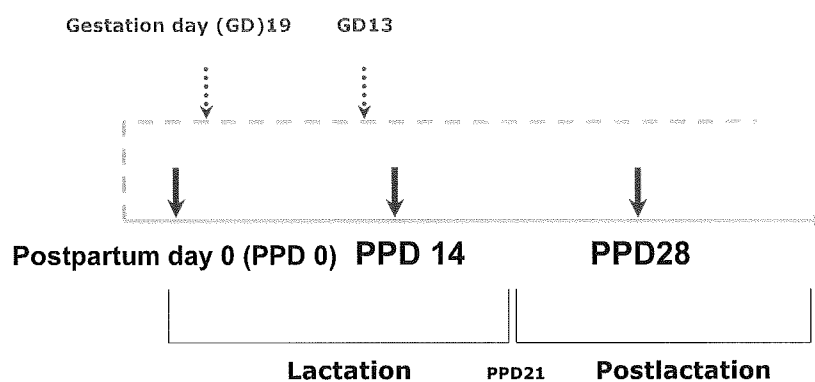
Animals:

Pregnant and age-matched non-pregnant female F344 rats (11 weeks of age)

Antibodies:

Monoclonal anti-rat CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2C12, CYP2D1, CYP2D4, CYP2E1, CYP3A1 and CYP4A1 antibodies

Experimental design



↓ : Sacrifice and obtain the livers

⋮ : Time point selected for cDNA microarray analysis

Methods:

Western blot analysis for

Quantitatively evaluating the changes in CYPs protein expression

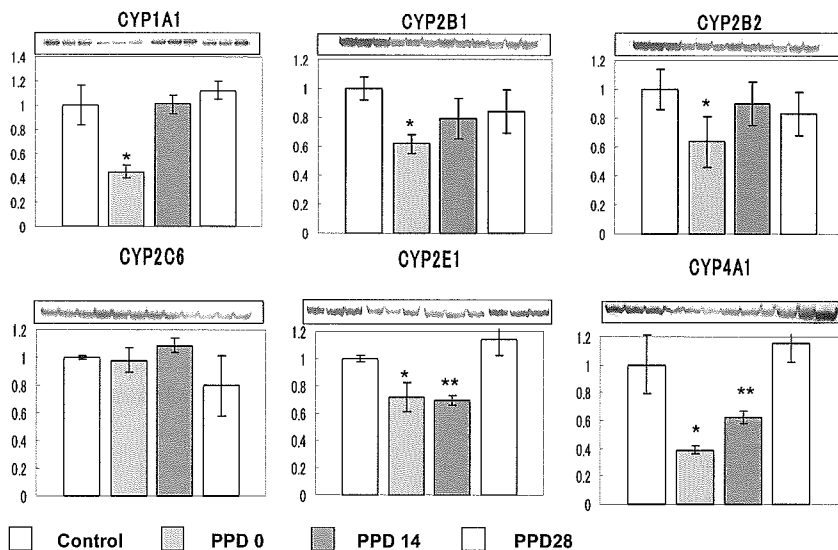
Immunohistochemical staining for

Evaluating the distribution and immunostainability of nine CYPs

Statistical analysis

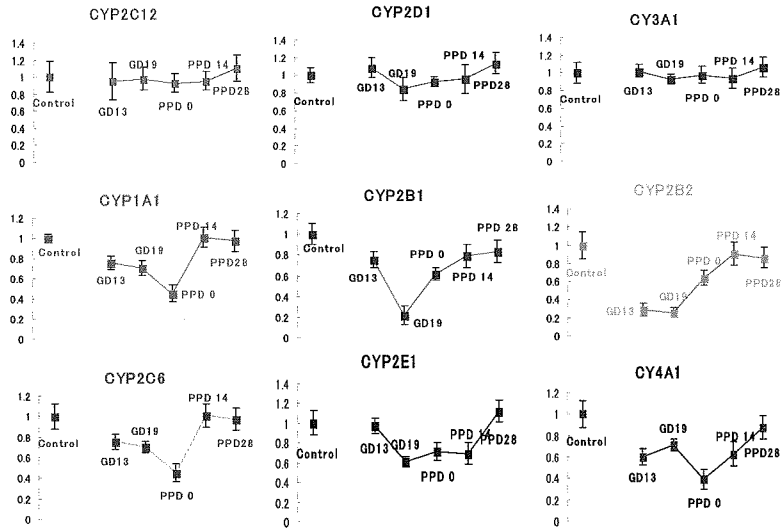
cDNA Microarray Analysis

Results- Findings of western blot analysis

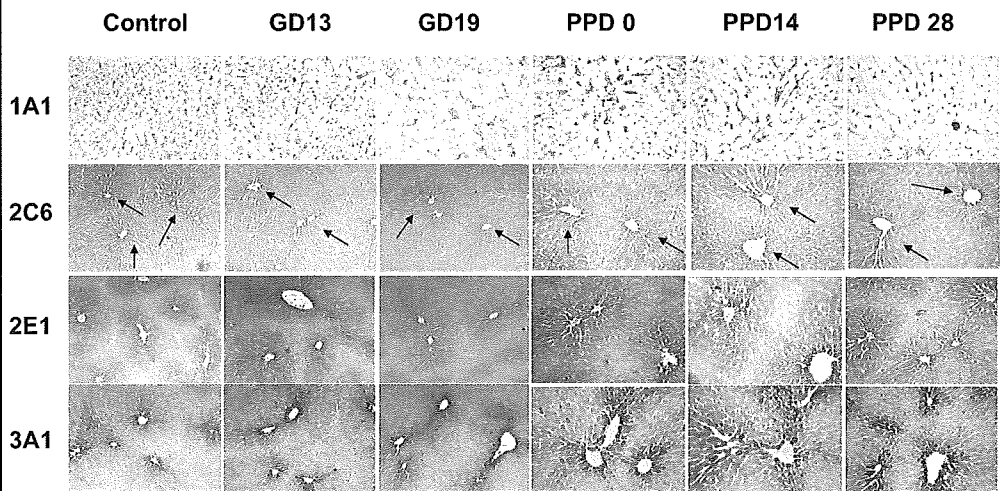


*P<0.01, **p<0.05 when compared with nonpregnant control rats. lane1-3: control; 4-6: PPD 0; 7-9: PPD 14; 10-12: PPD 28

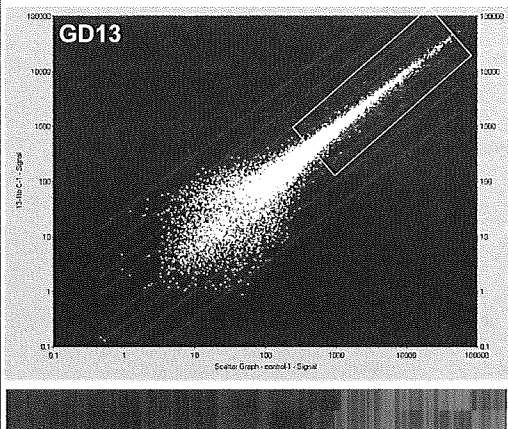
Changes in CYPs protein level during pregnancy, lactation and post-lactation



Findings of Immunohistochemistry

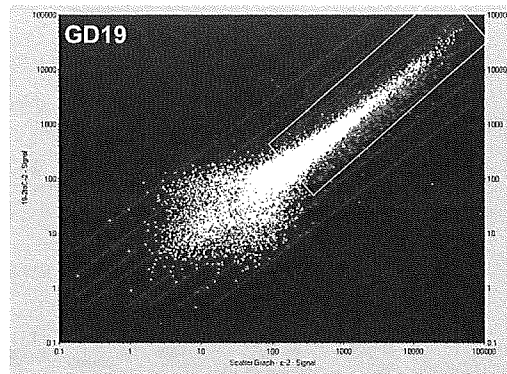


Findings of cDNA Microarray Analysis

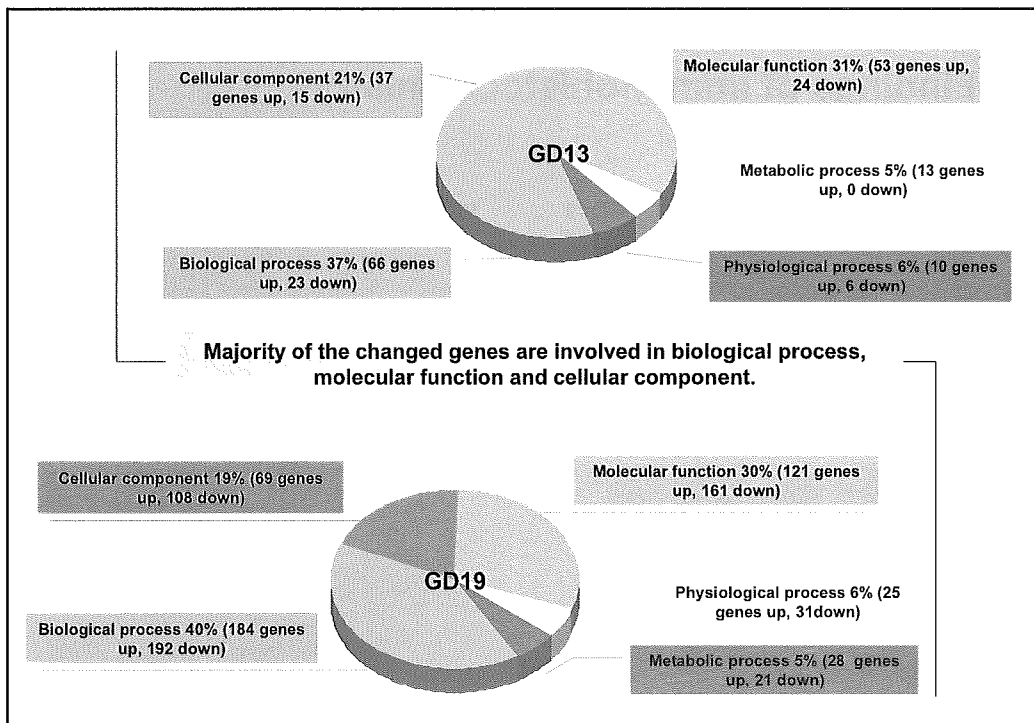


375 genes were modified (246 up and 129 down)

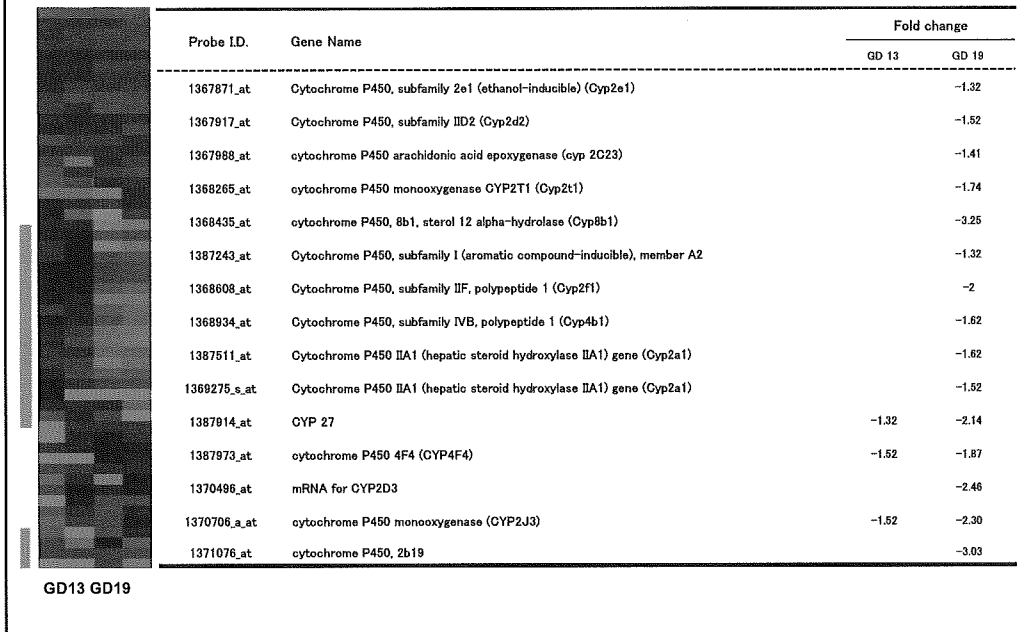
Distribution of fold-changes of gene expression on GD13 (left) and GD19 (right) as shown by scatter plots.



1092 genes were modified (513 up and 579 down)



Hierarchical Cluster analysis and expression data of down-regulated CYP genes



conclusions

Pregnancy was associated with down-regulation of protein levels of some CYPs in the rat liver. This was further demonstrated by Microarray analysis.

Down-regulated CYP450 isozymes during pregnancy could recover to the former level after delivery.



There were no differences in the degree of immunostainability for antibodies against nine CYPs between pregnant, postpartum and non-pregnant rat livers.

The characterization of the gene expression profile in rat livers during pregnancy will provide a basis for investigating toxicity of extraneous chemicals to fetus and mother and their metabolic rule during pregnancy.

**(3) cytosine arabinoside (Ara-C)の
胎児中枢神経系と胎盤における
毒性発現機構**

Introduction

Adequate placental function is crucial to the development of the fetus. Increased placental apoptosis is often observed concomitantly with placental dysfunction. Especially, apoptosis in trophoblast cell is thought to be related with intrauterine growth retardation or other abnormal pregnancies in human and experimental animals.

We previously reported that cytosine arabinoside (Ara-C) induced trophoblast cell apoptosis in rat placental labyrinth zone. Ara-C is a DNA damaging cytidine analogue and also well known as a teratogenic drug.

The tumor suppressor p53 has been implicated in cellular response to DNA damage. The aim of the present study is to investigate the mechanism of DNA damage-induced placental apoptosis in relation to p53 and other DNA damage-related proteins.

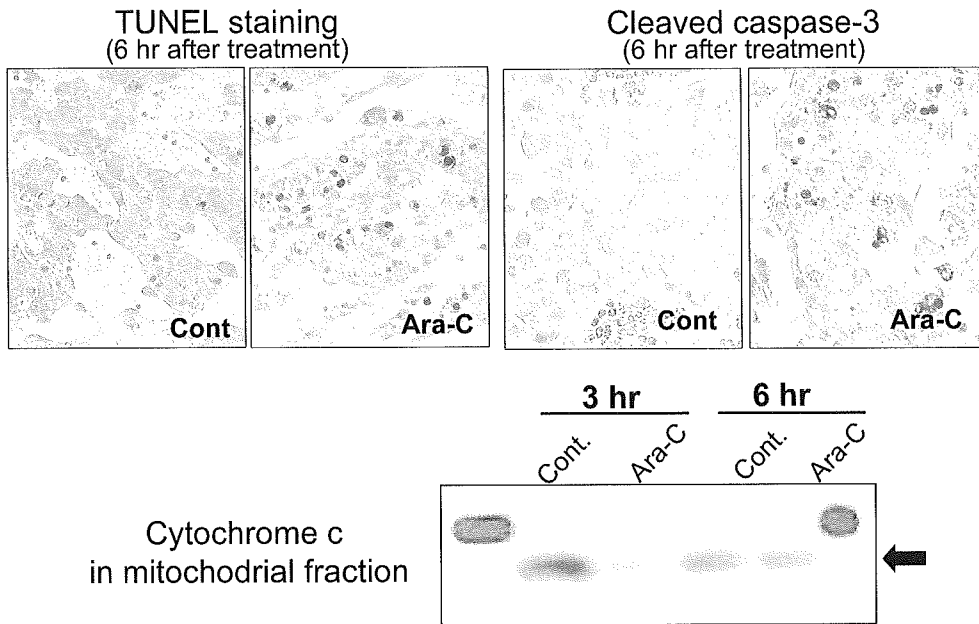
Methods

Pregnant Wistar rats were injected intraperitoneally with 250 mg/kg of Ara-C on day 13 of gestation and placenta were collected for histological examination, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), microarray and Western blot analyses.

For histological experiments with p53-deficient mice, heterozygous (p53^{+/-}) mice were crossed, and pregnant mice were injected intraperitoneally with 100 mg/kg of Ara-C on day 12 of gestation. Endogenous and disrupted genes were detected by PCR analysis of fetal tail for each placenta.

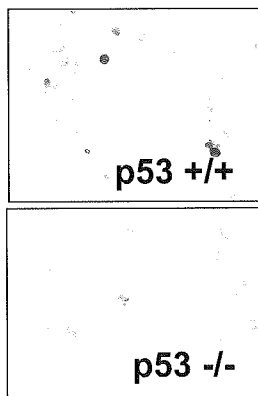
As controls, pregnant animals were injected with an equivalent volume of PBS.

Ara-C-induced trophoblast cell apoptosis in rat placenta

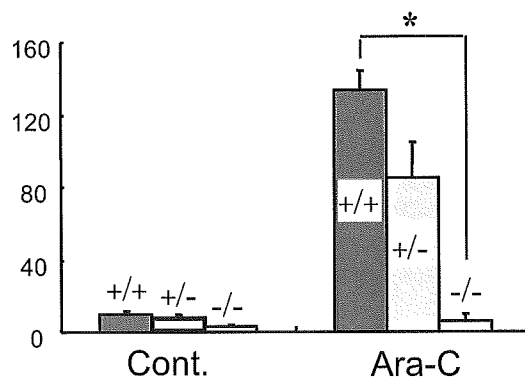


Essential role of p53 for Ara-C-induced trophoblast apoptosis

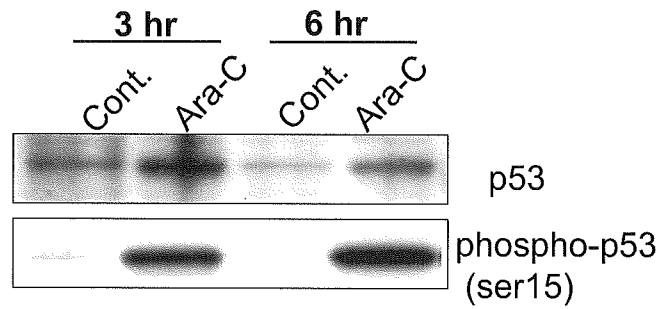
TUNEL staining



Apoptosis induction in labyrinth zone
(Number of TUNEL-positive cells per 4 high magnify microscopic fields)

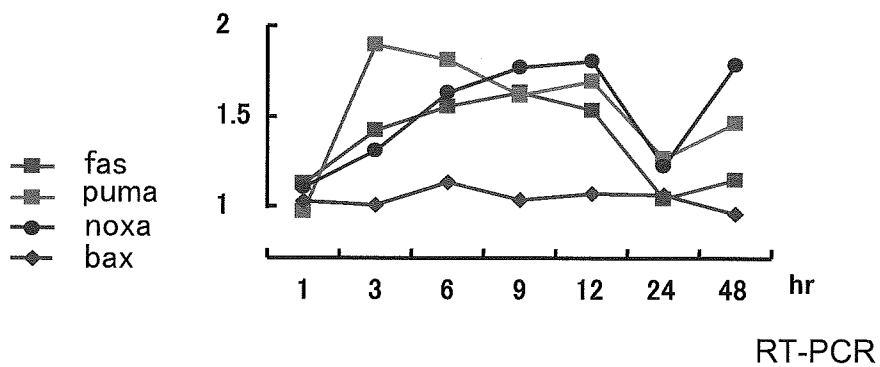


Activation and increase of p53 protein

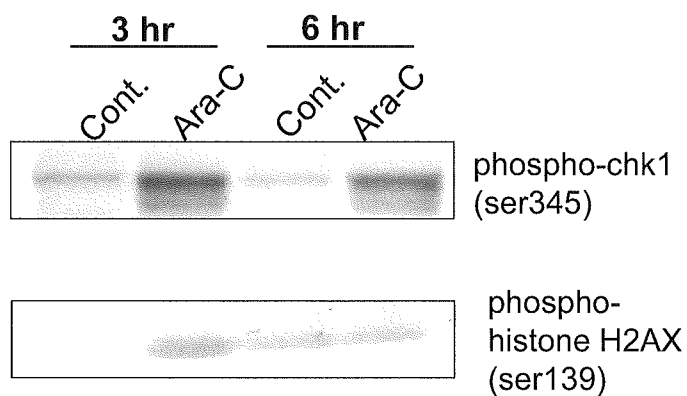


Up-regulation of p53 transcriptional target genes

mRNA expressions of
p53 target genes
(Relative ratio to controls)



Activation of DNA damage-mediating molecules

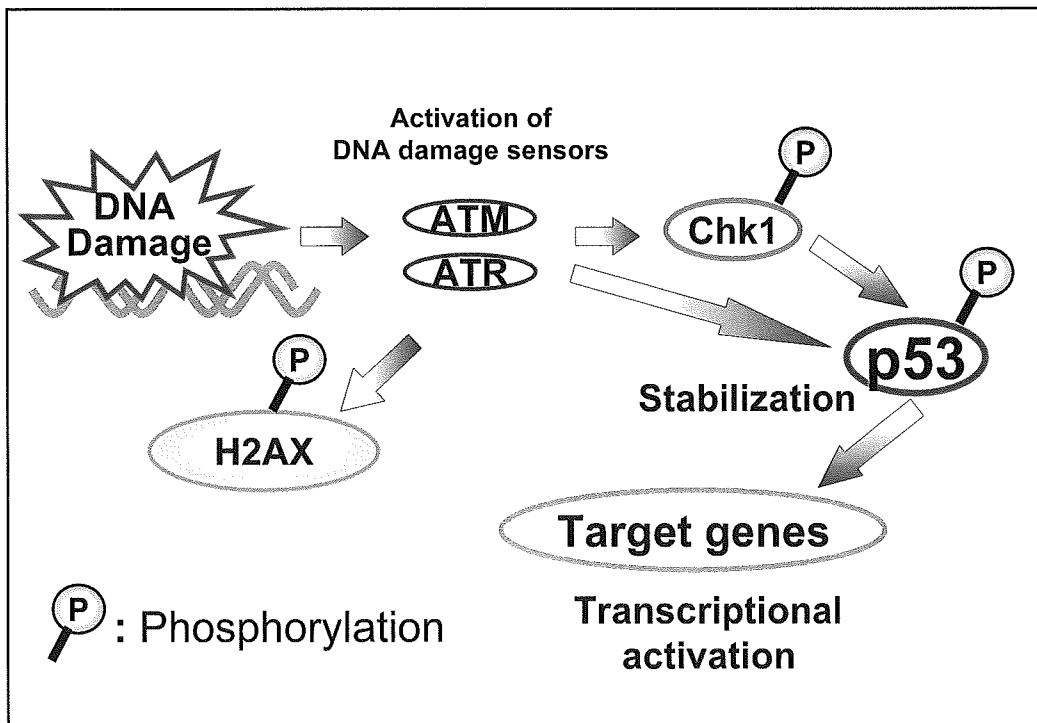


Changes of mRNA expression in placenta 6 hr after Ara-C treatment

Gene	Fold change (log 2)
<u>p53-target genes</u>	
Cyclin G1	0.7
p21	1.3
Apoptosis induction	
Transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3)	0.7
Apoptosis inhibition	
Glucocorticoid-induced leucine zipper (Gilz)	0.4
Serumglucocorticoid regulated kinase (Sgk)	0.4
Stress response	
Serumglucocorticoid regulated kinase (Sgk)	0.4
HIF-1 responsive RTP801 (Rtp801)	1.0
Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab)	0.6
Lipoplysaccharide binding protein	0.9
Proliferation	
Avian myelocytomatosis viral (v-myc) oncogene homolog (Myc)	-0.5

Conclusion

- ✓ Placenta is susceptible to genotoxic stress including DNA damaging agents which disrupt the regulation of trophoblastic cell death.
- ✓ In the pathogenesis of DNA damage-induced placental toxicity, p53 and its transcriptional target genes would play essential roles.
- ✓ Phosphorylation of p53, chk1, H2AX suggests that DNA damage signaling pathway (Fig.) is activated in placenta exposed to DNA damage.
- ✓ Microarray analysis suggest that multiple stress pathway are activated after Ara-C-treatment.
- ✓ Function of trophoblast cells in the placental labyrinth zone is indispensable for the growth, development and well-being of the fetus. Toxic effects of DNA damaging agents on trophoblast cells would disrupt the function of the placenta, resulting in abnormal fetal development.



研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究

分担研究者 金井 好克

杏林大学医学部・教授

化合物の腎毒性にはトランスポーター介在毒性が重要な位置を占め、その *in vitro* の評価系の確立が、*in vivo* における化合物の腎毒性予測のために必須である。トランスポーター（輸送体）は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の透過を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。腎には、広い基質選択性を有し異物排除や薬物やその代謝産物の排泄に関わる一群のトランスポーター（多選択性トランスポーター）が存在するが、その広い基質選択性のために毒性物質の細胞内侵入の経路となるため、そのようなトランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な因子となる。このようなトランスポーターが媒介する毒性機構（トランスポーター介在毒性）が、種々の腎毒性物質の *in vivo* での毒性発現の背景にあり、その評価を *in vitro* でできる評価系は、化合物の腎毒性予測において必須のものとなる。本年度は、腎有機アニオントランスポーター安定発現細胞を用いて、セファロリジンとオクラトキシンAのトランスポーター介在毒性を *in vitro* で再現できる評価系を確立した。これを用いマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現変動の観点から本評価系の有用性を実証した。さらに、マイクロアレイ解析により、セファロリジンのトランスポーター介在毒性には酸化ストレスがその背景にあることが実証された。また、全トランスポーター遺伝子の機能の解明は、腎毒性評価の精度を高めるための必須の要請であり、本研究においても、この要請に従い、機能未同定のトランスポーター遺伝子の機能解析を平行させている。本年度の研究において、特異な基質選択性を示す2種の新たな腎有機アニオントランスポーターが明らかになった。

A. 研究目的：

本研究では、生体内での腎の機能保持遺伝子の同定と化学物質により強く影響を受ける遺伝子を明確にするため、腎に発現する遺伝子の網羅的解析と腎作用化学物質に特異的に反応する遺伝子を特定し、続いて機能が明確にされている遺伝子を選別し、腎機能における役割と、当該遺伝子産物の特

異抗体による腎内及び細胞内局在を明らかにする。それらのマウスホモログを単離し遺伝子欠失動物の作出により、当該遺伝子の生理的意義と諸種化学物質による生体影響における毒性学的意義を明らかにする。

腎毒性の発現には、腎毒性物質の細胞内への侵入が第一のステップとなるが、特に尿管細胞は異物排泄のための多くのトラン

スポンターを備えているため、腎毒性発現にこれらのトランスポンターが重要な寄与をする。これらの代謝産物（有機酸等）や外来性異物の排出を担当するトランスポンターは、一般に特異性が低く多選択性トランスポンターと呼ばれ、多くの代謝産物や未知の外来性異物等にも対応できるようになっており、生体防御に適した特性を有している。しかし、その広い基質選択性のために毒性物質の細胞内侵入の経路となるため、そのようなトランスポンターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な因子となる。従って、DNA マイクロアレイ解析による化学物質の腎毒性の評価において、化学物質の腎毒性発現に関わるトランスポンターの全遺伝子の機能と化学物質の腎毒性発現における役割に関する情報が必須のものとなる。そこで本研究においては、腎型多選択性トランスポンターのファミリーである SLC22 の機能未同定の遺伝子の機能解析を先行させている。本年度は、SLC22 ファミリーの多選択性有機アニオントランスポンター 2 遺伝子の機能を明らかにした。

前述のように、腎毒性の発現には、腎毒性物質の腎尿細管細胞内への侵入が第一のステップとなる。腎毒性物質の多くは水溶性物質であり、それらは、腎尿細管細胞の血管側から取込まれ、管腔側から尿中に排泄される過程で、尿細管上皮細胞に毒性を発揮するとされる。従って、腎毒性物質の細胞内への取込みを媒介し、細胞内への取

込みの律速過程となるトランスポンターが、特定の腎毒性物質の腎毒性発現の規定因子として重要な要素となる。このような、トランスポンターを介した毒性（トランスポンター介在毒性）は、種々の毒性物質において実証されているが、化合物の腎毒性においては、特にセフェム系抗生物質セファロリジン及びカビ毒であるオクラトキシン A において良く知られている。セファロリジン及びオクラトキシン A とともに、腎近位尿細管の血管側の SLC22 ファミリーの多選択性有機アニオントランスポンター OAT1 及び OAT3 を介して腎近位尿細管細胞へ取込まれ、これによって腎毒性を発揮する（添付図 1 及び 2）。本年度の研究では、トランスポンター介在毒性の機序を明らかにし、*in vivo* の毒性発現における遺伝子変化を評価する *in vitro* のモデル系の構築とその評価の目的で、セファロリジン及びオクラトキシン A のトランスポンター介在毒性に関する DNA マイクロアレイ解析を行った。

B. 研究方法

（1）薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送体の分子同定及び機能解析。

有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸に関する既存のトランスポンターの塩基配列を用いて、公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベース及び EST (expressed sequence tag) データベースの BLAST 検索を行った。その結果得られた

BLAST hit を用いて、全長 cDNA を単離した。全長 cDNA の単離は、ゲノム DNA から PCR により DNA 断片を増幅し、それをプローブとして cDNA ライブラリーを hybridization によりスクリーニングするか、あるいは全長 cDNA が、各種 EST (expressed sequence tag) プロジェクト等で入手可能な場合は、それを入手して使用した。

得られた全長 cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。膜貫通部位の予想は、TopPred2、SOSUOI 等の膜貫通部位予想アルゴリズムによって行った。

プラスミドベクター pSPORT1 に挿入されている cDNA を発現プラスミドベクター pcDNA 3.1 にサブクローニングし、挿入部の 3'-末端外側を制限酵素で切断して、直線化した。これから、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、Cap analogue の存在下で *in vitro* 転写を行い、Cap 化された cRNA を合成した。エタノール沈澱にて精製後、マイクロピペットを用いてアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入 (50 nl/oocyte) することにより、発現させた。2-3 日間培養の後、放射能標識基質を培地中に添加し、卵母細胞への取り込みを測定することにより、機能活性を評価した。放射能標識基質の卵母細胞内への取り込みは、卵母細胞を界面活性剤で溶解後、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

加えて、発現プラスミドベクター pcDNA3.1 を用いてマウス腎近位尿細管由来 S2 細胞に遺伝子導入して安定発現細胞を作出し、同様に輸送機能の解析を行った。目的トランスポーター遺伝子 cDNA を挿入した pcDNA3.1 及び対象として挿入 cDNA を持たない pcDNA3.1 ベクター (mock) を、リポフェクタミンを用いてリポソーム法により S2 細胞に導入した。遺伝子導入後、G418 存在下で培養し、遺伝子導入細胞を選択し、クローニングした。得られた細胞クローンから poly(A)⁺RNA を抽出し、RT-PCR 法により、導入トランスポーター遺伝子の安定発現を確認した。安定発現細胞は、24 穴プレートに 2 日間培養後、放射能標識基質の輸送活性測定に供した。

(2) セファロリジン及びオクラトキシン A の毒性評価

有機アニオントランスポーター OAT3 安定発現 S2 細胞あるいは mock-S2 細胞を、 2.5×10^3 /well の密度で 48 穴プレートに蒔き、24 時間後に化合物暴露を開始した。化合物暴露後、12、24、36、48、120 時間後に MTT アッセイを行い、細胞毒性を評価した。セファロリジンは、0.2 mM、オクラトキシン A は 1 μ M、OAT3 インヒビターである Probenecid は、0.01-0.5 mM を検討した。

(3) 遺伝子発現変動の解析

有機アニオントランスポーター OAT3 安

定発現S2細胞あるいはmock-S2細胞を、 $6 \times 10^5/90$ mm pateの密度で蒔き、24時間後に化合物暴露を開始した。化合物暴露後、12、24、36、48、60時間後にRNAを抽出し、Human Whole Genome (Amersham Biosciences)を用いて遺伝子発現を測定した。ハイブリダイゼーション、及び解析をCodeLinkシステムによって行った。

遺伝子発現変動解析は、腎毒性物質がトランスポーターを介して、あるいはトランスポーターを介さずに（細胞膜脂質二重層を直接透過して）遺伝子発現に影響を与えるため（図3）、図4に示すように、「未処理（対照）」群（図4のA）、「腎毒性物質処理」群（図4のB）、「腎毒性物質処理+トランスポーター抑制薬」群（図4のC）、「トランスポーター抑制薬」群（図4のD）のそれぞれに関して、マイクロアレイ解析を行い、各発現量を図4に提示する数式を用いて「トランスポーター抑制薬により抑制される成分」を算出し、トランスポーター介在毒性に関わる遺伝子発現変動として評価とした。

図4に提示する数式から算出される遺伝子発現変動値のトランスポーター介在成分が2倍以上の変化を示した遺伝子群を対象とし、それらのパスウェイ解析と遺伝子のcis element解析を行った。転写領域解析は、K mean クラスタ後、クラスタごとに解析した。各遺伝子の転写開始点上流1000塩基と下流100塩基を解析の対象とした。

（倫理面への配慮）

本年度は、ヒト個人を対象とした研究や、個々人の遺伝子の解析等は含まない。本年度は、主にヒト由来のすでに確立された細胞株、及びアフリカツメガエル卵母細胞を実験に使用した。実験動物としては、アフリカツメガエルのみを用い、その使用にあたっては、麻酔下での操作を実施し、十分な配慮のもとに行った。

C. 研究結果

（1）薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送体の分子同定。

SLC22 ファミリーの代表的遺伝子である有機アニオントランスポーターOAT1 の翻訳領域の塩基配列を用いて公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベース及びEST (expressed sequence tag)データベースのBLAST 検索を行い、2種のOAT1 類似配列（OAT-PG、OAT9）を見出した。これに相当するcDNAを得、それを用いて機能解析及組織発現の検討を行った。

- OAT-PG

マウス OAT-PG は、ヒト有機アニオントランスポーターOAT1 と40%、ヒト有機アニオントランスポーターOAT2 と38%、ヒト有機アニオントランスポーターOAT3 と39%、ヒト有機アニオントランスポー

ターOAT4 と 43% のアミノ酸配列の相同性を有する、SLC22 ファミリーの有機アニオントランスポーター群に含まれる分子である。

OAT-PG の cDNA の断片を ^{32}P -dCTP でラベルしてプローブとして、マウス各組織から抽出した poly(A)⁺RNA を用いて、ノーザンブロッティングを行なった。その結果、腎のみにハイブリダイゼーションバンドが検出され、OAT-PG が腎特異的に発現する遺伝子であることが明らかになった。

OAT-PG の予想されるアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドに対する特異抗体を Altman らの方法に準じて作製した [Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第 81 巻、2176-2180 項、1984 年]。常法に従い、マウス腎パラフィン切片をペプチドアフィニティー精製抗 UST 6 抗体 (1:100) で処理後、ジアミノベンチジンで発色した。また、染色の特異性を検討する目的で、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原ペプチドの存在下でペプチドアフィニティー精製抗 OAT-PG 抗体 (1:100) で処理する実験も行った。その結果、腎近位尿細管細胞及び遠位尿細管細胞に染色が見られ、この染色は、抗原ペプチドの存在下で抗 OAT-PG ペプチドアフィニティー精製抗体を作用させた場合には検出されず、染色の特異性が示された。

OAT-PG の機能解析の目的で、OAT-PG の cDNA を発現プラスミドベクター pcDNA3.1 にサブクローニングし、マウス腎

近位尿細管由来 S2 細胞に遺伝子導入して安定発現細胞 S2-OAT-PG 細胞を作出した。S2-OAT-PG 細胞は、予備的検討として行った OAT-PG cRNA を注入して発現させたアフリカツメガエル卵母細胞と同様に、 ^3H プロスタグランジン E1 (1 nM)、 ^3H プロスタグランジン E2 (1 nM)、 ^3H プロスタグランジン D2 (1 nM) 及び ^3H プロスタグランジン F2 α (1 nM) の取り込み活性を示した。

S2-OAT-PG 細胞による ^3H プロスタグランジン E2 (1 nM) の取り込み実験において、系への各種有機アニオン及び有機カチオン添加の影響を調べたところ、有機アニオン及び有機カチオンのうちで、sulfobromophthalein (BSP)のみが 1 μM の濃度で有意な cis-阻害効果を示した。また、濃度を高めることにより、フロセミド、インドメタシンをはじめとする多くの有機アニオンが、S2-OAT-PG 細胞による ^3H プロスタグランジン E2 の取り込みを阻害することが明らかになった。

以上のように OAT-PG は腎近位尿細管及び遠位尿細管に存在するプロスタグランジンに選択性のある有機アニオントランスポーターであり、薬物やその代謝産物を含む有機アニオンにも親和性を示すトランスポーターであることが明らかとなった。

- OAT9 (ORCTL3)

マウス OAT9 (ORCTL3) は、SLC22 ファ

ミリーの各有機アニオントランスポーターと36%程度の相同性を有していた。OAT9は、構造的にはSOSUIアルゴリズムにより12の膜貫通領域が予想され、他のSLC22ファミリーのメンバーと類似の膜貫通トポロジーを示すが、以前からSLC22ファミリーに知られていた有機アニオントランスポーター(OAT)サブファミリー、有機カチオントランスポーター(OCT)サブファミリー、カルニチン/有機カチオントランスポーター(OCTN)サブファミリーのいずれにも属さず、新たなサブファミリーターを形成する。

OAT9のcDNAの断片を³²P-dCTPでラベルしてプローブとして、マウス各組織から抽出したpoly(A)⁺RNAを用いて、ノーザンブロッティングを行なったところ、腎にハイブリダイゼーションバンドが検出された。腎には2つの異なったサイズのmRNAが発現していたが、マウス及びヒトゲノムを解析したところ、約98%の相同性を示す2つの遺伝子が、マウス、ヒトともに同一のゲノム上のlocusにタンデムに並んで存在することが明らかとなった。腎に検出された2つの異なったサイズのmRNAは、このタンデムに配列した別個の遺伝子の転写産物の可能性がある。

OAT9のcDNAを鋳型として作製したDIG-標識RNAプローブを用いて、マウス腎凍結切片に対して*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果、腎髄質外層外

帯から髓放線にかけて尿細管に一致して強い陽性シグナルが観察された。

OAT9の予想されるアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドに対する特異抗体を作製し、マウス腎凍結切片をペプチドアフィニティー精製抗OAT9抗体(1:100)で処理後、ジアミノベンチジンで発色した。また、染色の特異性を検討する目的で、100µg/mlの抗原ペプチドの存在下でペプチドアフィニティー精製抗OAT9抗体(1:100)で処理する実験も行った。その結果、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果と一致し近位尿細管細胞に染色が見られ、この染色は、抗原ペプチドの存在下で抗OAT9ペプチドアフィニティー精製抗体を作用させた場合には検出されず、染色の特異性が示された。OAT9の染色は、腎近位尿細管細胞の管腔膜に限局し、OAT9タンパク質は腎近位尿細管細胞管腔膜に存在することが明らかになった。

OAT9の機能解析の目的で、OAT9のcDNAを発現プラスミドベクターpcDNA3.1にサブクローニングし、マウス腎近位尿細管由来S2細胞に遺伝子導入して安定発現細胞S2-OAT9細胞を作出した。S2-OAT9細胞は、予備的検討として行ったOAT9cRNAを注入して発現させたアフリカツメガエル卵母細胞と同様に、[¹⁴C]ニコチン酸を高親和性に輸送した。これに加え、オルト酸、サリチル酸、プロスタグランジンE2に対する輸送活性が検出された。しかし、