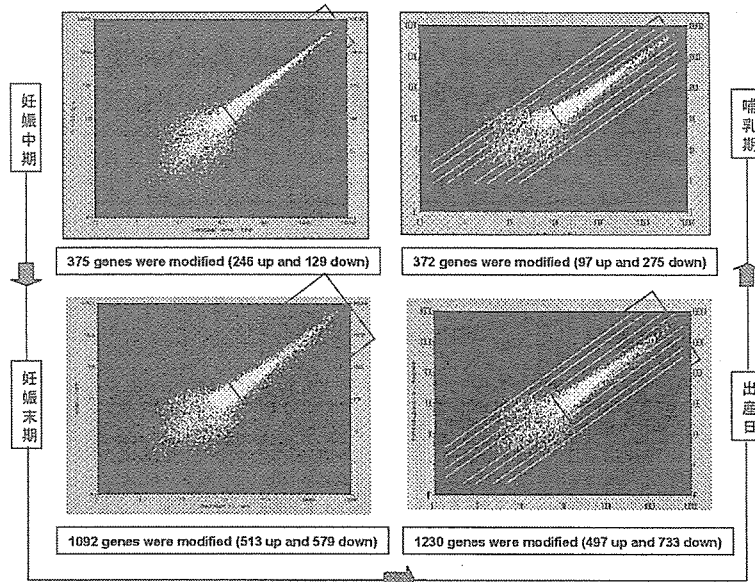
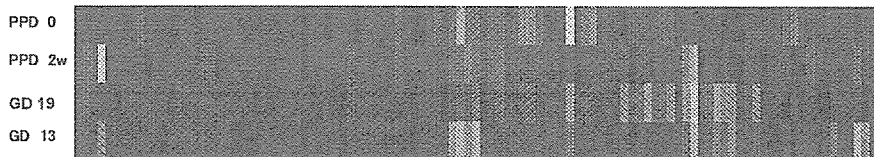


Distribution of fold-changes of gene expression during pregnancy and lactation as shown by scatter plots



Modified genes implicated in drug metabolism

Gene family	Probe ID	Accession number	GeneBank definition and comment	Fold change			
				GD 13	GD 19	PPD+ 0	PPD 2w
	1367871_at	gbNM031540.1	Cytochrome P450, subfamily 2e1 (ethanol-inducible) (Cyp2e1)		-1.27		
	1367917_at	gbNM012730.1	Cytochrome P450, subfamily BD2 (Cyp2d2)		-1.68		
	1367888_at	gbU04733.1	cytochrome P450 arachidonic acid epoxidase (cyp 2C23)		-1.46		
	1387106_at	gbNM031576.1	P450 (cytochrome) oxidoreductase (Por)		-1.48		-1.62
	1368265_at	gbNM134369.1	cytochrome P450 monooxygenase CYP2T1 (Cyp2t1)		-1.87	-2.14	
	1368435_at	gbNM031241.1	cytochrome P450, 8b1		-2.83		
	1367240_at	gbK02422.1	Cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), member A2	-1.32	-1.37	-1.57	-1.52
CYPs	1368608_at	gbNM019300	Cytochrome P450, subfamily III, polypeptide 1 (Cyp2f1)		-1.93	-2.38	-1.27
	1368934_at	gbNM016969	Cytochrome P450, subfamily IVB, polypeptide 1 (Cyp4b1)		-1.74		
	1367511_at	gbNM012892	Cytochrome P450 II A1 (hepatic steroid hydroxylase II A1) gene (Cyp2a1)		-1.52	-2.14	
	1369275_s_at	gbNM012692.1	Cytochrome P450 II A1 (hepatic steroid hydroxylase II A1) gene (Cyp2a1)		-1.57	-2.14	
	1367914_at	gbM03231.1	CYP 27	-1.87	-2.3		
	1370377_at	gbM25143.1	cytochrome P450CYP1b		-1.87	-1.52	
	1367973_at	gbUG9206.1	cytochrome P450 4F4 (CYP4F4)	-1.52	-1.8		
	1370496_at	gbAB006424.1	mRNA for CYP2D3		-2.46	-1.62	
	1370703_s_at	gbUG6943.1	cytochrome P450 monooxygenase (CYP2J3)	-1.46	-2.46		
	1371078_at	gbA054613	cytochrome P450, 2b19	-2.14	-2.84	-1.32	



Modified genes implicated in drug metabolism

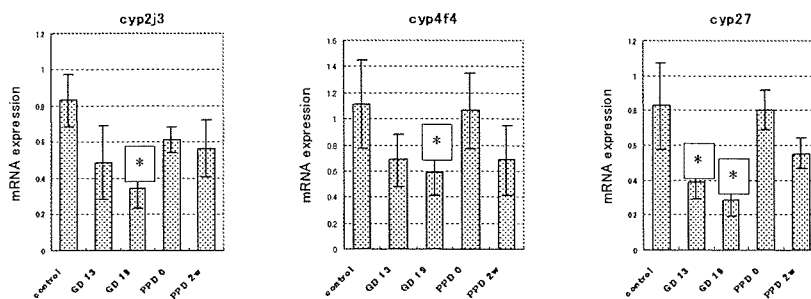
Gene family	Probe ID	Accession number	GeneBank definition and comment	Fold change			
				GD 13	GD 19	PPD 0	PPD 2w
Ephx1	1397669_s_at	gbNM_02344	Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase) (Ephx1)	-1.57	-1.74	-2.14	
nuclear receptor	1397152_at	gbNM_021861	nuclear receptor binding factor 2 (Nrbf2)		-1.41		
	1368376_at	gbNM_067133.1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)	-1.8	-2.83		-2.64
	1368797_at	gbNM_022941.1	nuclear receptor (CAR) (Nr1h3)	-2.22	-2.14	1.93	
	1359073_at	gbNM_021745.1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (Nr1h4)		-1.57		
	1369270_at	gbNM_062900.1	nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2 (Nr1h2)		-1.62		-1.46
	1370541_at	gbU20761	nuclear receptor Rev-Erba-beta mRNA		-1.62	1.68	
GST	1366865_at	gbM33241.1	Glutathione S-transferase, mu type 2 (Yb2)	-1.46	-1.74	-1.8	
	1367023_at	gbNM_011541.1	glutathione S-transferase, mu type 3 (Yb3) (Gstm3)	-1.52	-1.62	-2	
	1368054_at	gbNM_032323.1	Glutathione S-transferase 1 (theta) (Gstt1)		-2.55	-4.44	
	1368409_at	gbNM_027951.1	glutathione S-transferase, theta 2 (Gstt2)	-1.46	-1.68	-2.07	
	1370952_at	gbAI165331	Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)		-1.62	-3.88	
UDPGT	1369822_at	gbBE13469	Highly similar to GTO1_RAT GLUTATHIONE TRANSFERASE OMEGA 1		-1.52		
	1387709_s_at	gb_U001210	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A		-1.46		
	1370613_s_at	gbAF461730.1	UDP-glucuronosyltransferase 1A7		-1.62		

1. Ephx1: microsomal epoxide hydrolase gene.
2. nuclear receptor superfamily members mediate the induction of CYP2, CYP3 and CYP4
3. The glutathione S-transferases (GST) are phase II conjugation enzymes that play key roles in detoxification.
4. The UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) family plays a major role in the excretion of endobiotics and xenobiotics and their metabolites.

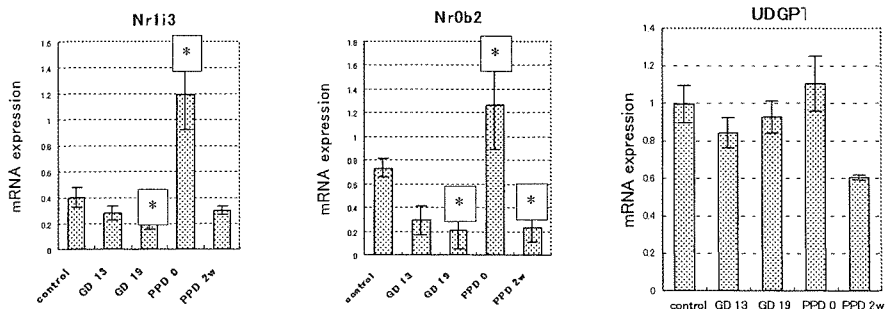
Verification of cDNA microarray analysis by quantitative real-time PCR

- For real-time PCR, RNA was prepared from four groups of rats (midpregnancy, late pregnancy, delivery, and lactation). Real-time PCR was performed using gene-specific primers. We chose a group of genes that were known to be putatively involved in the drug metabolism, including CYPs, nuclear receptor, GST (glutathione S-transferases), UDPGT(UDP-glucuronosyl transferase) and Ephx1 (microsomal epoxide hydrolase). For all of the genes tested, the results from microarray and real-time PCR were in agreement, with small standard deviation values. Both microarray and real-time PCR showed considerable decreased level of DMEs (drug metabolising enzymes)-related genes.

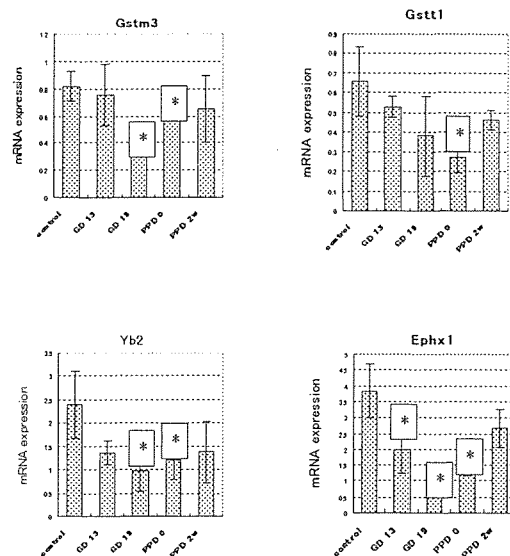
Validation of cDNA microarray results by real-time PCR (1)



Validation of cDNA microarray results by real-time PCR (2)

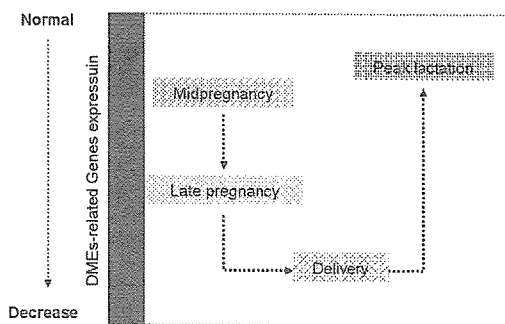


Validation of cDNA microarray results by real-time PCR (3)



Modified genes implicated in oxidative stress

Gene Function	Probe ID	Accession Number	GeneBank definition and comment	GD 13	GD 19	PPD 0	PPD 2w
Induction of antioxidant genes	1367759_s_at	gb J02612	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6 (Ugt1a6)	-1.46			
	1368309_at	gb NM_022584.1	thioredoxin reductase 2 (Txnrd2)			-1.62	
	1370688_at	gb J05181.1	Glutamylcysteine gamma synthetase light chain (Gclc)		1.52	1.41	
	1368409_at	gb NM_012796.1	glutathione S-transferase, theta 2 (Gstt2)	-1.46	-1.68	-2.07	
	1369061_at	gb NM_053906.1	glutathione reductase (Gsr)			-1.82	
	1370172_at	gb AA892254	Superoxide dismutase 2, mitochondrial (Sod2)			-1.41	
	1368322_at	gb NM_012880.1	Superoxide dismutase 3 (Sod3)			-1.32	
Repression of ROS-producing systems	1370946_at	gb BF420722	Nfix		-2.46		



There was a decrease of the gene expression in the group of drug metabolizing enzymes (DMEs) during pregnancy and lactation in rat liver. This downregulation was more significant on late pregnancy and delivery, and thereafter most of downregulated genes return to the normal level when detected on peak lactation.

The data from microarray presented suggest that expression profiling could provide a robust platform for better understanding the mother's and fetus's susceptibility to the exogenous toxin.

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(トキシコゲノミクス研究事業)
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、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* で行い得る評価系は、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、昨年度に引き続き、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のトランスポーター介在毒性に関するDNAマイクロアレイ解析を行い、セファロリジン腎毒性に関わるパスウェイを明らかにした。この過程で、セファロリジンによる酸化ストレスに対する細胞の自己防御に関わる転写因子が明らかになった。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、本年度の研究においては、特異な基質選択性を示す腎有機アニオントランスポーターの機能をノックアウトマウスを用いたメタボローム解析により明らかにした。

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ー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ー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ーターは、一般に特異性が低く多選択性トランスポーターと呼ばれ、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ーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の原因となる。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ー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ー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ーターの 1 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、尿管上皮細胞に毒性を發揮するとされる。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ーターが、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、トランスポーターを介した毒性（トランスポーター介在毒性）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ーター OAT1 及び OAT3 を介して腎近位尿管細胞へ取込まれ、これによって腎毒性を發揮する（添付図 1）。本年度の研究では、トランスポー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、昨年度に引き続きセファロリジンのトランスポーター介在毒性に関する DNA マイクロアレイ解析を行い、セファロリジン腎毒性に関わるパスウェイを明らかにした。

B. 研究方法

（1）薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送体の機能解析。

昨年度の研究において作出した OATN1 (OAT9: ORCTL3) をマウス腎近位尿管由来 S2 細胞に安定発現させた S2-OATN1 細胞を 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。輸送活性測定においては、放射能標識基質を培地中に添加し、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。放射能標識基質の細胞内への取り込みは、細胞をアルカリ溶解後、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

（2）OATN1 (OAT9: ORCTL3) のノックアウトマウスのメタボローム解析

OATN1 ホモノックアウトマウス及び野生型マウスの尿を採取し、キャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いて解析した。尿中全化合物のプロファイリングを行い、ホモノックアウトマウスと野生型マウスで尿中排泄量に差のある化合物を検出した。

(3) セファロリジンの毒性評価

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、48、72、96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、OAT3インヒビターであるProbenecidは、0.01-0.5 mMを検討した。

(4) 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、 6×10^5 /90 mm plate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2に示すように、「未処理(対照)」群(図2のA)、「腎毒性物質処理」群(図2のB)、「腎毒性物質処理+トランスポーター抑制薬」群(図2のC)、「トランスポーター抑制薬」群(図2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

2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2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 クラスター後、クラスターごとに解析した。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。

(5) 遺伝子発現変動の半定量的及び定量的解析

DNA マイクロアレイにより遺伝子発現変動が認められた遺伝子に関して、サイクル数を至適とした RT-PCR による半定量的 PCR 解析、及び TaqMan PCR による定量的 PCR 解析を施行した。

TaqMan PCR には、Applied Biosystems 社より購入した以下の TaqMan プローブ及びプライマーを用いた。Nfe2l2: Assay ID Mm01275375_m1, Probe ID 359930, Amplicon length 61; Gclc: AssayID Mm00802655_m1, Probe ID 323718, Amplicon length 98; Gclm: AssayID Mm00514996_m1, Probe ID 436575, Amplicon length 76; Slc6a9: AssayID Mm00433662_m1, Probe ID 532295, Amplicon length 75; Slc7a11: AssayID

Mm00442530_m1, Probe ID 473767,
Amplicon length 66。

(6) siRNA による遺伝子ノックダウン。
Nfe2l2 及び Nfkb1 の遺伝子ノックダウンを
siRNA を用いて行った。60mm のディッシュ
に S2-OAT3 細胞を 1.6×10^5 個播き、24 時間
後に siRNA を 50nM の濃度で LIPOFECTAMINE
を用いて添加した。さらに 24 時間後にセフ
ァロリジン (0.2 mM) を添加し、12 時間培養
後、RT-PCR 用に RNA を抽出した。また、セ
ファロリジンの細胞毒性に対する遺伝子ノ
ックダウンの効果の検討には、上記の siRNA
処理、セファロリジン添加後、細胞毒性を
MTT アッセイにより経時間的に評価した。

SiRNA は、Dharmacon 社から購入した以
下のものを用いた。ON-TARGETplus Duplex
J-040766-06-0005, Mouse NFE2L2,
NM_010902

Nfe2l2 sense: uggaguaagucgagaaguguu
Nfe2l2 antisense: 5'-P
cacuucucgacuuacuccauu;

ON-TARGETplus Duplex J-047764-06-0005,
Mouse NFKB1, NM_008689

Nfkb1 sense: ggaacgcccagaagcuuuuu
Nfkb1 antisense: 5'-P
auaagcuucuggcguuuccuu;

Negative siRNA: siCONTROL Non-Targeting
siRNA #1 from Dharmacon:
5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3'

(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
は実験動物としてはマウスのみを用い、その
使用にあたっては諸規定に則り十分な配慮
のもとに行った。

C. 研究結果

(1) OATN1 (OAT9: ORCTL3) のノックア
ウトマウスのメタボローム解析による機能同
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 検索により、昨年度
同定した OATN1 (OAT9: ORCTL3) の機能同
定を、ノックアウトマウスのメタボローム
解析により行った。

マウス OATN1 (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、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ものであった。

OATN1 (OAT9: ORCTL3) は、腎近位尿細管細胞管腔膜に存在するものであり、昨年度作製したマウス腎近位尿細管由来 S2 細胞を用いた安定発現細胞 S2- OATN1 細胞においては、ニコチン酸、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が、これは従来の生理学研究において記載された古典的輸送系と対応するものがなく、その生理的意義は、不明であった。

そこで、OATN1 のノックアウトマウスを用い、ノックアウト表現型から OATN1 の生体内での機能を明らかにすることを目的とした表現型解析を行った。OATN1 のホモノックアウトマウスの通常観察からは明らかな表現型は得られなかったため、OATN1 が近位尿細管の管腔側のトランスポーターであることを考慮し、その機能状態は尿中排泄化合物に鋭敏に反映されるはずであるとの予想のもとに、ノックアウトマウスを用いた尿中化合物の網羅的解析を行い、野生型と違いのある化合物を調べることにより OATN1 の生理機能を推察することを試みた。

尿中化合物を網羅的に分析するために、メタボローム解析の一つであるキャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いた。尿中化合物の多数のピ

ークから、野生型とノックアウトマウスで顕著な差が見られる 8 つのピークを見出し、そのうちの 하나가、精密分子量及びタンデム質量分析による化合物予測から β -ヒドロキシ酪酸と同定された。実際に放射能標識した β -ヒドロキシ酪酸を用いて、 β -ヒドロキシ酪酸が OATN1 によって輸送されることを S2- OATN1 細胞において実証した。

(2) セファロリジンのトランスポーター介在毒性

トランスポーター介在毒性を評価する *in vitro* のモデル系として、有機アニオントランスポーター OAT3 安定発現 S2 細胞 (S2-OAT3 細胞) が有用であることを昨年度の研究において明らかにしたが、本年度は、これを用いてセファロリジンのトランスポーター介在毒性のパスウェイを決定することを目的とした一連の解析を行った。

S2-OAT3 細胞の培養開始から 24 時間後にセファロリジン (0.2 mM) 及び OAT3 インヒビターである Probenecid (0.1 mM) を添加し、その効果を検討した。化合物暴露後、12、24、48、72、96 時間後に MTT アッセイを行い、細胞毒性を評価した。0.2 mM のセファロリジン暴露に対して、OAT3 トランスポーターインヒビター Probenecid は、濃度依存的な抑制効果を示したが、0.1 mM の Probenecid ではそれ自体の毒性がほとんど検出されず、セファロリジン (0.2 mM) の毒性を十分に抑制した (図 3)。以上のように

に、本評価系で、セファロリジンの OAT3 を介するトランスポーター介在毒性が検出できていることを確認した。

(3) セファロリジンのトランスポーター介在毒性の遺伝子的背景

上記で決定した条件(セファロリジン0.2 mに対して、Probenecid 0.1 mM) では、図4に示すように、セファロリジン暴露により大きな遺伝子発現変動が観察されるが、これはトランスポーターインヒビターである Probenecid (0.1 mM) によって抑制された。Probenecid (0.1 mM) 自体では大きな遺伝子発現変動は誘発されなかった(図4)。この事実は、図3に示した細胞毒性についての検討結果と良く一致するものである。

トランスポーター介在毒性の遺伝子的背景を明らかにする目的で、図2に示すように、「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た。これは、暴露腎毒性化合物による遺伝子発現変動は、トランスポーターを介する成分とトランスポーターを介さない成分からなるため、純粹にトランスポーターを介する成分のみを抽出する必要があるためである。図2に提示する数式から算出される遺伝子発現変動値を対象として、以下の解析を行った。

図5に、セファロリジンによる発現変動のプロファイルを示す。12時間では発現変動

する遺伝子の数とその程度は低いですが、24時間後より多くの遺伝子の大きな発現変動が観察されている。

12時間の時点で発現変動の見られた遺伝子に対して、パスウェイ解析を行った結果を図6の左に示す。この図には、発現変動の見られた遺伝子(青地に黄文字)から想定されるその発現変動の背景にある転写因子(白地に赤文字)も加えてある。図6の右は、12時間の時点で発現変動の見られた遺伝子群(図6左)とパスウェイ解析によって関連付けられる36時間の時点で遺伝子発現変動を示す遺伝子群である。図6左と同様に、発現変動の背景にある転写因子も加えてある。

図6で示される遺伝子群を再度パスウェイ解析によって相互の関連性を図示したのが図7である。図7は、グルタチオン生成に関連する遺伝子群とストレス応答に関連する遺伝子群とからなる。グルタチオン生成に関連する遺伝子群には、酸化ストレスとの関連で発現が変動することが知られているものが含まれる。slc7a11はシスチントランスポーター、slc6a9はグリシントランスポーターであり、それぞれグルタチン生成の基質としてのシスチン(細胞内でシステインとなる)とグリシンを細胞に供給する。Gclc (glutamate-cysteine ligase の catalytic subunit) と Gclm (glutamate-cysteine ligase の modifier subunit) は、グルタチン生成に関わる酵素

のサブユニットである。これらは、酸化ストレスに際して発現が上昇し、細胞がグルタチンを生成して、酸化ストレスに対抗するために必要な要素である(図8)。以上のように、セファロリジンにより酸化ストレスが細胞に生じていることが、遺伝子発現変動から推察される。

今回のマイクロアレイ解析から得られた遺伝子発現変動とパスウェイ解析、転写因子解析から予想されるその背景にある転写因子に関して、図9-11に示すように、半定量 RT-PCR により発現変動の確認を行った。図9-11に示すように、Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212、Myd116、Trp53、Ifi30 において、セファロリジン処理後の発現変動の応答の時間経過はそれぞれ異なるが、いずれにおいてもセファロリジンにより上昇し、さらに Probenecid を加えることによってその上昇が抑制されることが確認された。

酸化ストレスに応答したグルタチオン生成に深く関わりと考えられる Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212 については、さらに TaqMan PCR による定量 PCR 解析を行った。図12に4時間における解析結果、図13に12時間における解析結果を示す。図13から明らかのように12時間においては、Gclm、Gclc、slc6a9、slc7a11、Nfe212 ともに、セファロリジン処理により遺伝子発現が有意に上昇しているが、これにさらに Probenecid を加えることによってその

上昇が抑制されていることが確認された。

(4) セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景にある酸化ストレスの実証

以上より、セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景に酸化ストレスがあることが示されたが、それを実証する目的で、セファロリジンのトランスポーター介在毒性に対する抗酸化物質の効果を検討した。図14に示すように、MTT アッセイで評価したセファロリジンの S2-OAT3 細胞に対する毒性は、抗酸化作用のある N-アセチルシステイン及び alpha-トコフェロールによって抑制され、セファロリジン毒性の背景に酸化ストレスがあることが確認された。

この条件下で、抗酸化物質によるセファロリジン毒性の軽減にともない、セファロリジンによる遺伝子群発現変動が変化するかどうかを検討した。その結果を、図15及び図16に半定量 PCR、図17に定量 PCR として示す。これらの図に示されるように、特に N-アセチルシステインによって、セファロリジンによって亢進した遺伝子発現が抑制されることが明らかになった。このように遺伝子発現変動を指標としても、セファロリジンのトランスポーター介在毒性の背景に酸化ストレスがあることが実証されたことになる。

(5) セファロリジン処理による遺伝子発現変動の背景に同定された転写因子の役割

の検討

図7に示すように、セファロリジン処理による遺伝子の発現変動の背景に種々の転写因子が想定される。このうち、酸化ストレスに応答して細胞の防御に働くグルタチン生成系の遺伝子を発動する位置に想定されている転写因子としてNfe212とNfkb1に着目して、そのsiRNAによるノックダウンを行い、これらの転写因子のセファロリジンに対する細胞応答における意義を検討した。

Nfkb1のノックダウンは細胞死をまねき今回の目的における解析が行い得なかったが、Nfe212のノックダウンにより、図18および図19に示すように、セファロリジンによる遺伝子発現変動の程度が軽減されることが示された。同時に、Nfe212のノックダウンは、図20に示すように、セファロリジンの細胞毒性を増強することも明らかになった。これは、Nfe212が、セファロリジンによって惹起される酸化ストレスに反応して細胞がグルタチン生成系を発動して自己防御するために重要な転写因子であることを示すものである。

D. 考察

トランスポーターは、もともとは細胞が栄養素を取り込み、代謝産物や異物を排泄するために成立し、進化してきたものと考えられる。従って、トランスポーターの第一の役割は、「個々の細胞の生存維持」であ

り、生存に必要な栄養素（糖、アミノ酸、脂肪酸、ヌクレオシド、ビタミン等）の細胞への供給、及び代謝産物（有機酸、尿酸等）や外来性異物の排出を行うことである。細胞への栄養素の供給を担当するトランスポーターは、一般に特異性が高く、必要な栄養素を必要なだけ取り込むのに適している。これに対して、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ーターは、一般に特異性が低く、限られた分子種で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。

この広い基質選択性は、時には災いし細胞障害の誘因となることがある。それは、トランスポーターが毒性化学物質通過の経路となり、トランスポーターが存在するためにかえってその毒物に対する感受性が賦与される場合である。その顕著な例がMPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)によって惹起されるパーキンソン症候群である。MPTPは脳内で酸化されMPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium)となり、これがドパミントランスポーターの基質となるためドパミントランスポーターが存在するドパミン作動性神経終末から取り込まれてドパミン作動性神経細胞を破壊する。また、薬物の細胞毒性も、細胞が特定の薬物を輸送することにより生じる場合がある。その例として、セファロリジン腎障害があげられる。セファロsporin系抗生物質であるセファロリジンの腎毒性は、近位尿細管の血管側の有機アニオントランスポーターを介して、セファロリジンが尿細管上皮細胞に取り込まれることによって生じる。また、メチル水銀は、生体内でシステインと結合

してメチオニン類似の構造を取るため、アミノ酸トランスポーターを介して体内に分布し細胞内に取り込まれ、毒性を発揮する。このようにトランスポーターが存在することが細胞毒性発現の原因となることがある（トランスポーター介在毒性、Transporter-mediated toxicity）。

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、特に尿細管細胞は異物排泄のための多くのトランスポー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ー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ーターは、一般に上述の特異性の低い多選択性トランスポーターであり、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。こ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。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ーターの全遺伝子の機能と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ため、本研究は、腎型多選択性トランスポー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。同時に他のトランスポーターファミリーにおいても化学物質の腎毒性発現に関わる遺伝子の同定を平行させている。

本研究において、すでに数種の SLC22 トランスポーターファミリーの新規トランスポーターを同定したが、昨年度分子同定した OATN1 (OAT9: ORCTL3) は、*in vitro* の安定発現細胞を用いて検出した輸送機能が、従来の生理学研究において記載された古典

的輸送系のなかに対応するものがなく、その生理的意義が不明であったものである。そこで、その機能を明らかにする目的で、本年度は、OATN1 のノックアウトマウスを用い、ノックアウト表現型から OATN1 の生体内での機能を明らかにすることを目的とした表現型解析を行った。

OATN1 のホモノックアウトマウスは、通常観察からは明らかな表現型は得られなかったため、OATN1 が管腔側のトランスポーターであることを考慮し、その機能状態は尿中排泄化合物に鋭敏に反映されるはずであるとの予想のもとに、ノックアウトマウスを用いた尿中化合物の網羅的解析を行い、野生型と違いのある化合物を調べることにより OATN1 の生理機能を推察することを試みた。

本研究では、尿中化合物の網羅的解析には、メタボローム解析の一つであるキャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせた CE-MS 法を用いた。CE-MS 法は、微量試料でも解析が可能であり、マウス尿などの成分分析にも効果的である。また、電荷を持った低分子化合物がその対象となり、これは、トランスポーター、特に有機イオントランスポーターの基質の測定に適している。CE-MS 法を用いることにより、従来技術的に不可能であった尿中全化合物の定量的把握が可能になりつつある。

CE-MS 法によるメタボローム解析により、 β -ヒドロキシ酪酸が OATN1 の生体内での輸送基質として同定された。 β -ヒドロキシ酪酸は、アセト酢酸、アセトンと共にケトン体に属するもので、飢餓や糖尿病に伴い、脂肪酸の β 酸化が充進した際に主に肝臓

で作られ、肝外組織へ運ばれて取り込まれ、ATP合成を行うためのアセチルCoAの材料になる。

従って、OATN1は、ケトン体の renal handling に重要な役割をはたしていると考えられるため、その役割を明らかにするために糖尿病マウス（血中のケトン体濃度を上昇させた状態）を用いた予備的検討をすでに行っている。Alloxan 処理により糖尿病状態（ケトン体が高濃度に血中に存在する状態）を惹起すると、OATN1 ノックアウトマウスにおいて多量のケトン体が尿中に排泄されることが明らかになった。OATN1 は飢餓や糖尿病においてエネルギー源となるケトン体の再吸収を担っていると考えられる。

本研究により、腎尿細管に未だに数多く残されている機能未同定のトランスポーターの機能特定に、CE-MS 法による遺伝子ノックアウトマウスのメタボローム解析が有用であるが示された。また機能活性が示されているトランスポーターであっても、従来の研究の手技上の制約からそれが本来の生体内での機能を反映しているものかどうかは定かでないことから、本手法は、それらも含めて、腎尿細管トランスポーターの生理機能の解明あるいは再評価のための必須の情報を提供するものと期待される。

さて、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が、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。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ーターが、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が、このようなトランスポーター介在毒性の例として、セファロリジンを対象として解析した。

セファロリジンは、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ーターOAT1 及び OAT3 を介して腎近位尿細管細胞へ取込まれ、腎毒性を惹起する。培養細胞系に高濃度の化合物を用いると、種々の非選択的な経路を経て毒性を発揮するが、実際の in vivo での毒性は、多くのアニオン系の腎毒性物質が有機アニオントランスポーターへの親和性のため選択的に尿細管細胞に取込まれて、比較的低濃度域で発生する毒性が临床上問題となる。従って、多くの in vitro の毒性実験が扱っている高濃度暴露によって生じる細胞毒性は、実際の生体内で生じる毒性を反映しているとは言い難い。そこで、本研究は、毒性物質が高親和性にトランスポーターによって選択的に輸送されることにより毒性を発揮する系を in vitro で構築し、その系を用いて腎毒性化合物の毒性評価と、その毒性発現機序の検討を行うこととした。この方針のもとに、本年度の研究において、腎毒性物質として知られるセファロリジンのトランスポーター介在毒性を in vitro で検討した。

昨年度の研究においてすでに確立したトランスポーター介在毒性評価系を用い、マ

マイクロアレイ解析を行ったところ、腎毒性物質によって惹起される遺伝子発現変動が、トランスポーターインヒビターにより抑制されることが確認され、遺伝子発現変動の観点からも、本評価系がトランスポーター介在毒性評価系として適したものであることが検証された。

本評価系において、セファロリジンにより、特にグルタチオン生成系の遺伝子発現亢進と細胞のストレス応答に関する遺伝子の発現亢進が観察された。これは、セファロリジン細胞毒性の背景に酸化ストレスがあることを示唆し、従来のセファロリジン毒性の細胞内機序に関する仮説を網羅的解析の観点から実証するものである。本研究では、さらにセファロリジン細胞毒性の背景に酸化ストレスがあることを確認するために、セファロリジン細胞毒性に対する抗酸化物質の効果を検討した。抗酸化物質は、セファロリジン細胞毒性を軽減し、セファロリジンによる遺伝子発現変動を低下させることが明らかになった。これにより、酸化ストレスがセファロリジン細胞毒性の背景にあることについてのさらなる確証が得られたことになる。

本研究により、セファロリジンにより発現変動する遺伝子群の背景に種々の転写因子が想定された。本研究では、酸化ストレスに応答して細胞防御に働くグルタチオン生成系の遺伝子を発動する位置に想定された転写因子について、siRNAによるノックダウンを行ったが、そのうちNfe212のノックダウンがセファロリジンによる遺伝子発現亢進の程度を軽減させることが明らかになった。さらに、Nfe212のノックダウンは、セファロリジンの細胞毒性を増強すること

も明らかになった。これは、Nfe212が、セファロリジンによって惹起される酸化ストレスに応答して、細胞がグルタチオン生成系を発動して自己防御するために重要な転写因子であることを示すものである。

E. 結論

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に必須である。本研究は、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、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を示し、さらに抗酸化物質の遺伝子発現への効果を検討し、これを実証した。また、セファロリジンによる遺伝子発現変動の背景に想定される転写因子のうち、Nfe212がセファロリジンによる酸化ストレスに対する細胞の自己防御において重要な役割を果たすことを明らかにした。

F. 健康危機情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion

- transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F251-F261, 2006.
2. Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H: Prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP 1A1, 1B1, and AhR by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 210: 200-211, 2006..
 3. Tsuji K, Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Bouvet M, Endo H, Kanai Y, Yamashita K, Moossa AR, Hoffman RM: Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res* 66: 303-306, 2006
 4. Nakanishi K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, Tominaga S, Mukai M, Ikeda E, Ozeki Y, Aida S, Kawai T: LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* 448: 142-150, 2006.
 5. Shigeta Y, Kanai Y, Chairoungdua A, Ahmed N, Sakamoto S, Matsuo H, Kim DK, Fujimura M, Anzai N, Mizoguchi K, Ueda T, Akakura K, Ichikawa T, Ito H, Endou H. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter. *Kidney Int.* 69:1198-1206, 2006.
 6. Brandoni A, Villar SR, Picena JC, Anzai N, Endou H, Torres AM. Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. *Hepatology.* 43:1092-1100, 2006.
 7. Price KL, Sautin YY, Long DA, Zhang L, Miyazaki H, Mu W, Endou H, Johnson RJ. Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol.* 17:1791-1795, 2006
 8. Anzai N, Kanai Y, Endou H. Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci.* 100:411-426, 2006.
 9. Tomimatsu M, Aizawa Y, Chuganji Y, Ishizuka H, Fujita Y, Aizawa R, Abe H, Matsuda T, Itou Y, Nakanishi H, Ushiyama H, Higuchi T, Fujimoto T, Endou H, Iga D, Ohta K, Kuroda H. Treatment effects and predictors of a 24-week course of interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 21:1177-1183, 2006
 10. Brandoni A, Anzai N, Kanai Y, Endou H, Torres AM. Renal elimination of p-aminohippurate (PAH) in response to three days of biliary obstruction in the rat. The role of OAT1 and OAT3. *Biochim Biophys Acta.* 1762:673-682, 2006

11. Noshiro R, Anzai N, Sakata T, Miyazaki H, Terada T, Shin HJ, He X, Miura D, Inui K, Kanai Y, Endou H. The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.* 70:275-282, 2006
12. Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H: L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int. J. Cancer* 119: 484-492, 2006.
13. Kim SG, Kim HH, Kim HK, Kim CH, Chun HS, Kanai Y, Endou H, Kim do K: Differential expression and functional characterization of system L amino acid transporters in human normal osteoblast cells and osteogenic sarcoma cells. *Anticancer Res.* 26: 1989-1996, 2006.
14. Asif AR, Ljubojevic M, Sabolic I, Shnitsar V, Metten M, Anzai N, Mueller GA, Burckhardt G, Hagos Y. Regulation of steroid hormone biosynthesis enzymes and organic anion transporters by forskolin and DHEAS treatment in adrenocortical cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291:E1351-E1359, 2006.
15. Kim SG, Ahn YC, Yoon JH, Kim HK, Park SS, Ahn SG, Endou H, Kanai Y, Park JC, Kim do K.: Expression of amino acid transporter LAT1 and 4F2hc in the healing process after the implantation of a tooth ash and plaster of Paris mixture. *In Vivo.* 20: 591-597, 2006.
16. Kim CH, Park KJ, Park JR, Kanai Y, Endou H, Park JC, Kim do K: The RNA interference of amino acid transporter LAT1 inhibits the growth of KB human oral cancer cells. *Anticancer Res.* 26: 2943-2948, 2006.
17. Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, Hano H, Endou H, Kanai Y: Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest.* 86: 1172-1184, 2006.
18. Ljubojevic M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolic I. Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292:F361-F372, 2007
19. Anzai N, Kanai Y, Endou H. New Insights into Renal Transport of Urate. *Curr Opin Rheumatol.* 19:151-157, 2007
20. Nilwarangkoon S, Anzai N, Shiraya K, Yu E, Islam R, Cha SH, Onozato ML, Miura D, Jutabha P, Tojo A, Kanai Y, Endou H: Role of Mouse Organic Anion Transporter 3 (mOat3) as a Basolateral Prostaglandin

- E(2) Transport Pathway. *J Pharmacol Sci.* 103:48-55, 2007.
21. Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Kanai Y, Endou H, Shiokawa Y, Nagane M: Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery* in press.
 22. 安西尚彦、Promsuk Jutabha、武藤朋子、金井好克、遠藤 仁：セファロリジン投与ヒト有機アニオントランスポーター1 安定発現近位尿細管細胞（S2-hOAT1）における網羅的遺伝子発現解析、腎とフリーラジカル第8集 芦田 明等編、東京医学社、2006、p.67-69
 23. 安西尚彦：抗不整脈薬の薬効及び体内動態に対するヒト有機カチオントランスポーター3（OCT3）の遺伝子多型（SNP）の影響、（財）中富健康科学振興財団・第17回研究助成業績集 平成18年度版、2006、p.67-69
 24. 安西尚彦、遠藤 仁：腎尿酸トランスポーターと血清尿酸値異常、医学のあゆみ第一土曜特集「水・電解質異常の新展開」、216(9):685-691, 2006
 25. 平田 拓、金井好克：腎におけるプロスタグランジンシグナリングの新展開、Annual Review 2007 腎臓、中外医学社、2007、p.42-49
 2. 口頭発表
 1. Li Y, Kanai-Azuma M, Hirata T, Anzai N, Kawakami H, Endou H, Kanai Y: Identification and functional characterization of a novel cationic amino acid transporter CAT5 specifically expressed in placenta. *Experimental Biology* 2006, San Francisco, U.S.A., Apr. 3, 2006
 2. Jutabha P, Chairoungdua A, Anzai N, Kanai Y: The voltage-driven organic anion transport of type I sodium-phosphate cotransporter and OATv1. *Experimental Biology* 2006, San Francisco, U.S.A., Apr. 4, 2006
 3. Hirata T, Shiraya K, Jutabha P, Muto T, Anzai N, Hatano R, Sanada S, Matsubara M, Muto S, Endou H, Kanai Y: Molecular identification of a novel prostaglandin-specific organic anion transporter that is colocalized with prostaglandin producing enzyme Cox-2 in the distal tubular cells. *Experimental Biology* 2006, San Francisco, U.S.A., Apr. 4, 2006
 4. Anzai N, Miyazaki H, Jutabha P, Kanai Y, Endo H: Role of intracellular C-terminal domain of the catalytic subunit of system b⁰⁺ for its trafficking and the RACK1 binding. *Experimental Biology* 2006, San Francisco, U.S.A., Apr. 4, 2006

5. He X, Anzai N, Ljubojevic M, Ueno T, Fukutomi T, Sakata T, Sabolic I, Hirata T, Endou H, Kana Y: Transport of nicotinate by human organic anion transporters of SLC22 family. *Experimental Biology* 2006, San Francisco, U.S.A., Apr. 4, 2006
6. 安西尚彦、平田 拓、金井好克：新規腎特異的プロスタグランジントランスポーターOAT-PGの同定と機能解析、第79回日本内分泌学会学術総会、神戸、平成18年5月20日
7. 金井好克：アミノ酸トランスポーター：その分子機構と病態。京都府立医科大学大学院医学研究科特別講演、京都、平成18年5月24日。
8. 安西尚彦、何 新、Ljubojevic M、Sabolic I、金井好克、遠藤 仁：ヒト有機アニオントランスポーターhOAT2のニコチン酸輸送と肝臓内発現、日本ビタミン学会第58回大会、徳島、平成18年5月28日
9. 金井好克：アミノ酸トランスポーター：その機能と病態。東京大学大学院薬学系研究科講演、東京、平成18年6月9日
10. 坂田 武、安西尚彦、成川新一、何 新、三浦大作、遠藤 仁、金井好克：有機カチオントランスポーターOCT3(SLC22A3)の遺伝子多型(SNPs)と輸送機能解析第114回日本薬理学会関東部会、習志野、平成18年6月10日
11. 金井好克：イオン輸送と輸送体・最近の知見、第49回日本腎臓学会学術総会教育講演、東京、平成18年6月14日
12. 瀬川博子、伊藤美紀子、安西尚彦、金井好克、宮本賢一：遺伝性低リン血症性くる病原因遺伝子 type IIc Na/Pi のPTHによる調節機構。第49回日本腎臓学会学術総会、新宿、平成18年6月14日
13. 安西尚彦、平田 拓、小泉昭夫、金井好克：Hartnup 病原因遺伝子産物B⁰AT1(SLC6A19)の上皮頂上膜移行を制御する結合タンパク質の同定。第49回日本腎臓学会学術総会、新宿、平成18年6月14日
14. 平田 拓、白矢勝子、Jutabha P、武藤朋子、安西尚彦、波多野亮、真田 覚、松原光伸、武藤重明、小野里マリステラリカ、藤乗嗣泰、遠藤 仁、金井好克：新規腎特異的プロスタグランジントランスポーターOAT-PGの同定とその機能解析。第49回日本腎臓学会学術総会、新宿、平成18年6月14日
15. 宮崎博喜、安西尚彦、金井好克、富田公夫、遠藤 仁：腎臓近位尿細管管腔側膜における有機陰イオン輸送の調節機構、第49回日本腎臓学会学術総会、新宿、平成18年6月14日
16. 安西尚彦、坂本信一、Chairoungdua A、市川智彦、遠藤 仁、金井好克：シスチントランスポーターBAT1細胞内C末端の細胞内輸送とタンパク質間相互作用