

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

平成30年度 分担研究報告書

腎障害の分子メカニズムに関する研究

研究分担者 松下 幸平

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 主任研究官

研究要旨

代償性反応は外来物質の暴露に対して種々の臓器に生じる生理現象である。代償性反応の重要性は Adverse Outcome Pathway (AOP) 開発プログラムにおいても説かれており、代償性反応に関する情報は Key event 間の定量的な理解に有用であるとされている。よって安全性研究者による代償性機構の機序解明研究の重要性は今後益々高まるものと考えられる。腎臓は化学物質による毒性の主要な標的臓器であり、その代償性反応として代償性肥大が知られている。この代償性肥大は腎障害の発現機序に関わらず共通して生じる現象であることから、代償性肥大の発現機序を詳細に理解することにより、新たな腎毒性評価分子を抽出することも期待できる。本研究では 10 週齢の雌雄 F344 ラットに片側腎摘出を施し、残存腎における代償性肥大の分子機構を解明し、腎毒性の AOP 作成に資する情報を得るとともに、新しい腎障害評価分子を抽出することを目的とした。

病理組織学および遺伝子発現解析の結果、雌雄ともに残存腎における細胞増殖活性が対照群と比して上昇しており、細胞周期停止に関わる transforming growth factor (TGF)- β 1 の mRNA 発現に処置による影響はみられなかった。mRNA マイクロアレイ解析では、対照群と比して処置群において雄では 320 個、雌では 233 個の遺伝子の発現が変動していた。パスウェイ解析の結果、雌雄ともに主に細胞増殖に関連するパスウェイの活性化が認められた。microRNA (miRNA) マイクロアレイの結果、9 種類の miRNA の発現低下が認められた。

以上の結果から、雌雄ともに腎代償性機構には細胞肥大ではなく過形成が寄与していることが明らかとなった。また miRNA マイクロアレイの結果から、腎臓の代償性機構における細胞増殖活性は miRNA に制御されていることが示唆され、これらの因子は新しい腎障害評価分子になることが期待された。今後、mRNA-miRNA 統合解析を実施し、腎代償性機構における miRNA の細胞周期制御機構について詳細に検討する予定である。

A. 研究目的

代償性反応は外来物質の暴露に対して種々の臓器に生じる生理現象である。化学物質の安全性評価において、化学物質暴露

により生体あるいは細胞に生じた反応が代償性反応であった場合は有害事象とは判断されないため、代償性機構に対する理解は毒性発現機序と同様に非常に重要である。

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) による Adverse Outcome Pathway (AOP) 開発プログラムにおいても代償性機構の理解に対する重要性が説かれており、代償性反応に関する情報は Key Event間の関係の定量的な理解に有用であるため、Key Event Relationshipの項目に記載することが推奨されている。よって、安全性研究者による代償性機構の機序解明研究の重要性は今後益々高まるものと考えられる。

腎臓は化学物質による毒性の主要な標的臓器であり、その原因としては腎血流量が豊富であるために化学物質に曝されやすいこと、尿の精製過程において原尿中の化学物質が濃縮されること、さらに尿細管内には多くの薬物代謝酵素が存在することなどが挙げられる。腎臓は多様な細胞により構成される臓器であるが、なかでも尿細管は尿細管腔から原尿中の化学物質を再吸収・代謝するという生物学的特徴から、最も障害を受けやすい細胞である。

腎臓には大きく2つの代償性機構が内在する。腎毒性物質による障害はネフロン単位で生じ、障害を受けたネフロンにおける代償性反応としては再生尿細管による組織の修復が知られている。一方、非障害ネフロンではいわゆる代償性肥大が生じる。腎毒性発現機序には種々の様式があることに対し、この代償性肥大は毒性機序に関わらず共通して生じる現象であることから、代償性肥大の発現機序を詳細に理解することにより、腎毒性機序に依存しない新たな腎毒性評価分子を抽出することも期待できる。

片側腎摘出モデル動物は腎代償性肥大の機序解明に汎用されているモデルであるが、その分子機構について一定の見解は得られていない。この理由としては、これまでの研究では種々の週齢および性別のラットおよ

びマウスを用いていることが考えられる。よって、安全性評価に資する情報を得るためには、毒性試験に汎用される週齢の雌雄ラットを用いた機序検討が有用であると考えた。

本研究では10週齢の雌雄F344ラットに片側腎摘出を施し、残存腎における代償性肥大の分子機構を解明し、腎毒性のAOP作成に資する情報を得るとともに、新しい腎障害評価分子を抽出することを目的とした。

平成30年度は雌雄ラットに片側腎摘出術を施して残存腎組織を採材し、細胞増殖活性を免疫組織学および遺伝子発現解析により検索し、さらに網羅的遺伝子発現解析によりmRNAおよびmicroRNA (miRNA) の発現を解析した。

B. 研究方法

10週齢の雌雄F344ラットをそれぞれ4群 (n=5) に配した後、イソフルラン深麻酔下にて片側腎 (左腎臓) 摘出術を施し、処置後1, 2および3日に安楽殺した。対照群には Sham処置として開腹術のみ実施し、処置後3日に同様に安楽殺した。細胞増殖活性の評価を実施するため、全ての動物について安楽殺の2時間前にbromodeoxyuridin (BrdU) を100 mg/kg体重の用量で単回腹腔内投与した。安楽殺時に右腎臓を採材して重量を測定した後、一部を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りの組織を液体窒素で瞬間凍結させ、-80℃にて保存した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋および薄切を行い、BrdU免疫染色およびPeriodic acid-Schiff stain (PAS) の二重染色を施して、近位曲尿細管、近位直尿細管および遠位尿細管におけるBrdU陽性細胞率を算出した。瞬間凍結サンプルからRNeasy Mini Kitによりtotal RNAを抽出し、real time RT-PCR

およびmRNAマイクロアレイに供した。また雄については凍結サンプルよりmiRNeasy Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイに供した。mRNAおよびmiRNAのマイクロアレイ解析は処置後2日および対照群のサンプルを用いて実施した。さらにIngenuity Pathways Analysis (IPA)により変動のあったmRNAについてパスウェイ解析を実施した。

腎臓の代償性機構の雌雄差をさらに検討するため、15週齢の雌雄F344ラットを3群(n=5)に配し、同様に片側腎摘出術を施して処置後2および3日の右腎臓においてBrdU陽性細胞率の算出およびreal time RT-PCRを実施した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

雌雄ともに片側腎摘出後の残存腎の重量が処置後2および3日に対照群と比して有意な増加を示した。残存腎の組織学的解析では、処置後2および3日において近位尿管、近位直尿管および遠位尿管のBrdU陽性細胞率が対照群と比して有意な上昇あるいは上昇傾向を示した。mRNA発現解析においてはcyclin E1の発現が雌雄ともに処置後1から3日で有意な上昇あるいは上昇傾向を示し、処置後2日が最も高値を示した。また、雌雄ともにtransforming growth factor (TGF)- β 1のmRNA発現に処置による影響はみられなかった。mRNAマイクロアレイ解析では、対照群と比して処置群において雄では320個、雌では233個の遺伝子の発現が

変動していた。IPAを用いたNew Comparison Analysisの結果、雌雄ともに主に細胞増殖に関わるCanonical Pathwayの活性化が認められた。

雄ラットにおけるmiRNAマイクロアレイ解析では対照群と比して処置群において9個のmiRNA (miR-1843a-5p, miR-1843a-3p, miR-194-3p, miR-222-3p, miR-31-5p, miR-340-5p, miR-450-5p, miR-653-5p, miR-9a-3p)発現が変動しており、全て発現低下を示した。

15週齢の雌雄F344ラットを用いた実験においても同様に、雌雄ともに対照群と比して処置後2および3日後の腎臓において重量の有意な増加、BrdU陽性細胞率の有意な増加およびCyclin E1の遺伝子発現の有意な上昇が認められた。一方、TGF- β 1の遺伝子発現に処置による影響はみられなかった。

D. 考察

腎臓の代償性肥大には細胞の増数(過形成)および細胞の大きさの増大(肥大)が寄与しているとされている。細胞周期のG1/S期移行が生じた際には細胞が分裂して過形成が生じ、反対にG1/S期でarrestが生じた場合には細胞周期が停止して肥大が生じることが知られている。TGF- β 1はG1/S arrestを誘導して肥大に寄与することが知られているが、本実験結果では雌雄ともにTGF- β 1の発現変動に片側腎摘出の影響はみられなかった。一方、片側腎摘出により雌雄ともに残存腎のBrdU陽性細胞率が上昇し、G1/S期移行に関与するCyclin E1のmRNA発現上昇がみられた。また、mRNAマイクロアレイのデータを用いたパスウェイ解析により、雌雄ともに細胞増殖に関与する経路が活性化していたことから、雌雄ともに腎代償性機構には細胞肥大ではなく過形成が寄与している

ことが示唆された。

miRNAマイクロアレイの結果、9種類のmiRNAの発現低下が認められた。miRNAはmRNAの3'-UTRへの結合を介してmRNAを分解することにより、mRNAの機能を転写後に抑制する。本実験結果では多数の細胞増殖関連遺伝子のmRNA発現上昇がみられたことから、発現が低下していたmiRNAは細胞周期を上流で制御している可能性が示唆された。

性成熟のさらに進んだ15週齢の雌雄ラットを用いて検討した結果、同様にBrdU陽性細胞率およびCyclin E1の遺伝子発現の上昇がみられ、TGF- β 1の遺伝子発現変動はみられなかったことから、少なくとも本実験条件下では腎臓の代償性機構に雌雄差はないと考えられた。

E. 結論

雌雄ラットの腎代償性機構には細胞の増数(過形成)が寄与していることを明らかにした。また細胞増殖活性の亢進はmiRNAにより制御されていることが示唆され、これらの因子は新しい腎障害評価分子になる可能性が期待された。今後、mRNA-miRNA統合解析を実施し、腎代償性機構におけるmiRNAの細胞周期制御機構について詳細に検討する予定である。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. Archives of toxicology 2019, doi: 10.1007/s00204-019-02396-8. [Epub

ahead of print]

2. Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of γ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. Journal of applied toxicology. 2019, doi: 10.1002/jat.3775. [Epub ahead of print]
3. Matsushita K, Takasu S, Kuroda K, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Mechanisms underlying exacerbation of osmotic nephrosis caused by pre-existing kidney injury. Toxicological sciences, 2018, 165 (2), 420-430.
4. Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. Regulatory toxicology and pharmacology, 2018, 100, 118-126.
5. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. Journal of Applied Toxicology. 2018, 38 (4), 537-543.
6. Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. The Journal of toxicological sciences. 2018, 43 (7), 423-433.

F.2. 学会発表

1. 1,3-Dichloro-2-propanolのF344ラットを用いた28日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索, 松下幸平, 豊田武

- 士, 森川朋美, 山田貴宣, 小川久美子, 第35回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
2. 膀胱癌がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱癌がんマーカーの探索, 豊田武士, 山田貴宣, 松下幸平, 森川朋美, 小川久美子, 第35回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
 3. 膀胱癌がん物質投与による γ -H2AX形成の用量相関性及び経時的変化, 山田貴宣, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小川久美子, 第35回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01, 国内.
 4. RNAアプタマーを用いた新規骨再生用材料の*in vivo*性能評価, 野村祐介, 藤澤彩乃, 松下幸平, 豊田武士, 福井千恵, 森下裕貴, 小川久美子, CHUNG Ungil, 中村義一, 齋島由二, 第40回日本バイオマテリアル学会, 2018/11/12, 国内.
 5. 膀胱癌がん性芳香族アミノ - toluidine の代謝物分析とDNA付加体, 田島悠也, 豊田武士, 平山裕一郎, 橋詰力, 松下幸平, 小川久美子, 渡辺賢二, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 第47回日本環境変異原学会大会, 2018/11/01, 国内.
 6. ラットを用いた2 - エチルブタナールの90日間亜慢性反復経口投与毒性試験, 森川朋美, 松下幸平, 豊田武士, 山田貴宣, 高橋美和, 井上薫, 小川久美子, 第24回日本食品化学学会, 2018/05/17, 国内.
 7. 膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討, 豊田武士, 戸塚ゆ加里, 松下幸平, 森川朋美, 山田貴宣, 三好規之, 若林敬二, 小川久美子, 第25回がん予防学術大会, 2018/06/27, 国内.

G. 知的財産権の出願・登録状況

G.1. 特許取得

該当なし

G.2. 実用新案登録

該当なし

G.3.その他

該当なし