

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

令和元年度 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。AOP 開発プログラムにおいて、代償性反応に関する情報は各 Key Event の関連性を理解するために有用であるとされており、安全性研究者による代償性機構の解明研究は今後益々重要にな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る。腎臓の代償性反応には 2 つの機構が存在し、障害部位で生じる尿細管再生および非障害部位で生じる代償性肥大が知られる。本研究では腎臓に内在する 2 つの代償性機構を解明することを目的とした。前年度から本年度にかけては、非障害部位における代償性肥大の分子機構を解明するため、10 週齢の雌雄 F344 ラットに片側腎摘出を施し、残存腎において mRNA および microRNA (miRNA) マイクロアレイならびに mRNA-miRNA 統合解析を実施した。その結果、雌雄ともに代償性肥大には転写因子である Forkhead box M1 を介した細胞増殖が寄与しており、その下流因子の発現調節には数種類の miRNA が関与していることが明らかとなった。引き続き、障害部位における尿細管の再生メカニズムを明らかにするため、急性腎障害モデルラットを用いた先行研究の再生尿細管における mRNA マイクロアレイのデータを再解析し、再生機構に関わると考えられる候補因子を抽出した。今後はこれらの因子の再生尿細管における発現動態を免疫組織学的に解析するとともに、腎線維化モデルラットを作製して線維化病変内の尿細管における発現も併せて解析し、尿細管の再生機構およびその破綻に関連する因子を探索する予定である。

**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変化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極めて重要である。

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、代償性反応に関する情報は各 Key Event の関連性を理解するために有用であり、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、その代償性反応として大きく2つの機構が知られている。腎毒性物質による障害はネフロン単位で生じることから、障害を受けたネフロンでは代償性反応として尿細管再生が生じ、非障害ネフロンではいわゆる代償性肥大が生じる。本研究ではこれらの2つの代償性反応の分子機構を解明することを目的とした。腎毒性発現機序には種々の様式があることに対し、代償性反応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、本研究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。

本年度では前年度に引き続き、非障害部位における代償性肥大の分子機構を解明するため、片側腎摘出モデルラットを用いてmRNAおよびmicroRNA (miRNA) マイクロアレイならびにmRNA-miRNA統合解析を実施した。さらに障害部位における尿細管の再生メカニズムに関与する因子を探索するため、急性腎障害モデルラットを用いた先行研究の再生尿細管のmRNAマイクロアレイのデータを再解析し、候補因子を抽出した。

## B. 研究方法

腎障害時に非障害領域で生じる代償性肥大の分子機構を解明するため、10週齢の雌雄F344ラットをそれぞれ6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, 3および7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および7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 染色 (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、RT-qPCR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、BrdU陽性細胞率ならびにcyclin E1およびcyclin B1のqPCR解析の結果に基づき、処置後2日および対照群のサンプルを用いて実施した。マイクロアレイにおいて変動のあったmRNAについては、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を実施した。

また、化学物質誘発急性腎障害モデルラットにおける代償性肥大の分子機構を探索する目的で、6週齢の雄性SDラットに125 mg/kgのFolic acidあるいは媒体である生理食塩水を単回腹腔内投与した。投与後1日に腎臓を採材し、左腎臓の皮質を肉眼的に分離して液体窒素で瞬間凍結させ、-80℃にて保存してqPCR解析に供した。右腎臓の組織を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、上記と同様に組織標本を作製してHE染色およびKi67免疫染色を行った。

尿細管の再生メカニズムに寄与する因子を探索するため、先行研究 (Matsushita et al., Toxicol Sci. 2018;165(2):420-430) における再生尿細管のmRNAマイクロアレイデータを再解析した。先行研究の研究方法を以下に簡潔に示す。10週齢の雌性F344ラットの左

腎臓に120分あるいは90分の虚血処置を施し、再灌流後それぞれ3および7日に安楽殺した。病理組織学的解析において、処置後3日には再生初期、7日には再生後期の再生尿細管がみられたため、凍結標本からレーザーマイクロダイセクションによりそれぞれの尿細管を採取し、mRNAマイクロアレイを実施して遺伝子発現プロファイルを対照群（Sham処置群）より採取した正常尿細管と比較した。

（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

片側腎摘出ラットにおける残存腎のBrdU免疫染色では、処置後2日以降において対照群と比して近位尿細管曲部、近位尿細管直部および遠位尿細管におけるBrdU陽性細胞率の有意な増加あるいは増加傾向がみられた（Figure 1）。mRNAのqPCR解析においては、雌雄ともに細胞増殖に関わるcyclin E1およびcyclin B1の発現が処置後2日以降に対照群と比して有意な増加あるいは増加傾向を示した（Figure 2）。一方、雌雄ともに細胞周期停止および細胞肥大に関与するtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1の発現に変動はみられなかった（Figure 2）。

mRNAマイクロアレイ解析では、対照群に比して雄では320遺伝子、雌では233遺伝子の発現が変動していた。IPAを用いたNew Comparison Analysisの結果、雌雄ともに細胞増殖に関わるCanonical Pathwayの活性化が認められた（Figure 3）。細胞増殖を制御する上流因子を検索するため、Upstream

Regulator Analysisを実施した結果、転写因子であるForkhead box M1 (FOXM1)が細胞周期関連遺伝子の上流因子として抽出された（Table 1）。qPCRにてFOXM1の発現動態を確認した結果、雌雄ともに処置後2日以降に対照群と比して有意な発現増加が認められた（Figure 4）。

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発現が低下していた（Table 2）。mRNA-miRNA統合解析では、miR-653-5p, miR-31-5pおよびmiR-9-3pはFOXM1の下流因子の制御に直接的に関与していること、さらにmiR-1843a-5p, miR-194-3pおよびmiR-31-5pはトランスフェリン受容体1を介して間接的にFOXM1の下流因子の制御に寄与していることが示唆された（Figure 5）。

腎障害物質であるFolic acidを投与したラット腎臓では、病理組織学的に髄質外層内帯の尿細管に壊死が認められ、非障害部位である皮質においては、Ki67に陽性を示す尿細管が増加した（Figure 6A）。非障害部位の皮質組織を用いたqPCR解析では、Folic acid投与群において対照群と比してcyclin E1およびFOXM1の発現が有意に増加していた一方、TGF- $\beta$ 1の発現に差は認められなかった（Figure 6B）。

尿細管の再生メカニズム研究では、腎障害モデルラットを用いた先行研究における再生尿細管のmRNAマイクロアレイのデータを再解析し、文献調査の結果に基づいて尿細管の再生機構に関与する候補因子として10個の因子（Survivin, RUNX1, CD44, Osteoactivin, Adrenoceptor alpha 1D, Kim1, SOX9, Osteopontin, CD133およびPAX2）を抽出した。

#### 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）が関与するとされている。これまでの報告により、代償性肥大の作用様式には種差、系統差および性差があることが示されているため、本研究では毒性試験で汎用される性成熟した雌雄のラットを用いて実験を行った。細胞周期のG1/S期あるいはG2/M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期あるいはG2/M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- $\beta$ 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- $\beta$ 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、それぞれG1/S期およびG2/S期移行に関与するcyclin E1およびcyclin B1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。以上の結果より、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。

Upstream Regulator Analysisの結果、FOXM1が細胞増殖の上流因子であることが示唆された。FOXM1は腸管等の細胞分裂の活発な正常組織や種々の腫瘍組織で高発現することが知られている。FOXM1はG1/S期およびG2/M期移行を促進することで細胞分裂を引き起こすため、FOXM1は腎臓における代償性肥大の作用様式を決定づける因子である可能性が考えられた。

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。mRNA-miRNA統合解析では、miRNAがFOXM1の下

流因子の制御に直接的あるいはトランスフェリン受容体1を介して間接的に関与していることが示唆された。腎腫瘍を含む種々の腫瘍組織において、細胞増殖活性の増加に伴って鉄の要求量が上昇し、トランスフェリン受容体1依存性の鉄の取込みが亢進することが報告されている。本研究結果より、腎臓の代償性肥大においても、トランスフェリン受容体1を介した鉄の取込みの亢進が生じていることが示唆された。

Folic acidを用いた急性腎障害モデルラットの腎臓において、非障害領域である皮質にKi67陽性を示す尿細管が増加し、FOXM1およびcyclin E1のmRNA発現が亢進した。以上の結果より、化学物質誘発腎障害における代償性機構においても、FOXM1を介した細胞増殖の亢進が寄与していることが考えられた。

腎臓の代償性反応として、障害部位では尿細管再生が生じる。腎障害が生じた際、障害を受けたネフロンでは壊死した尿細管に隣接する尿細管が脱分化して再生尿細管に形質転換し、活発に増殖した後、再分化して組織が修復され、腎機能は回復する。一方、この尿細管の再生機構が何らかの原因で破綻した場合は、不可逆的な線維化が生じ慢性病変へと進展する。よって、尿細管の再生機構およびその破綻に寄与する因子を同定することは、尿細管再生機構の破綻をKey Eventとした腎線維化のAOP開発の支援に繋がることを期待される。本年度は先行研究のmRNAマイクロアレイデータを再解析し、再生尿細管に発現する10種類の因子を尿細管再生に寄与する候補因子として抽出した。来年度にはこれらの因子の再生尿細管における発現動態を免疫組織化学的に解析するとともに、腎線維化モデルラットを作製し、線維化病変内の再生機構の破綻した尿細管

におけるこれらの因子の発現も併せて解析する予定である。

## E. 結論

腎臓の非障害部位における代償性肥大にはFOXM1を介した細胞増殖が寄与しており、その下流因子の発現調節にはmiRNAが寄与していることが明らかとなった。今後は尿細管の再生メカニズムを明らかにし、腎障害あるいは腎線維化のAOP開発に資する知見を提供したいと考える。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

1) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. Journal of Applied Toxicology. in press.

### F.2. 学会発表

該当なし

## 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

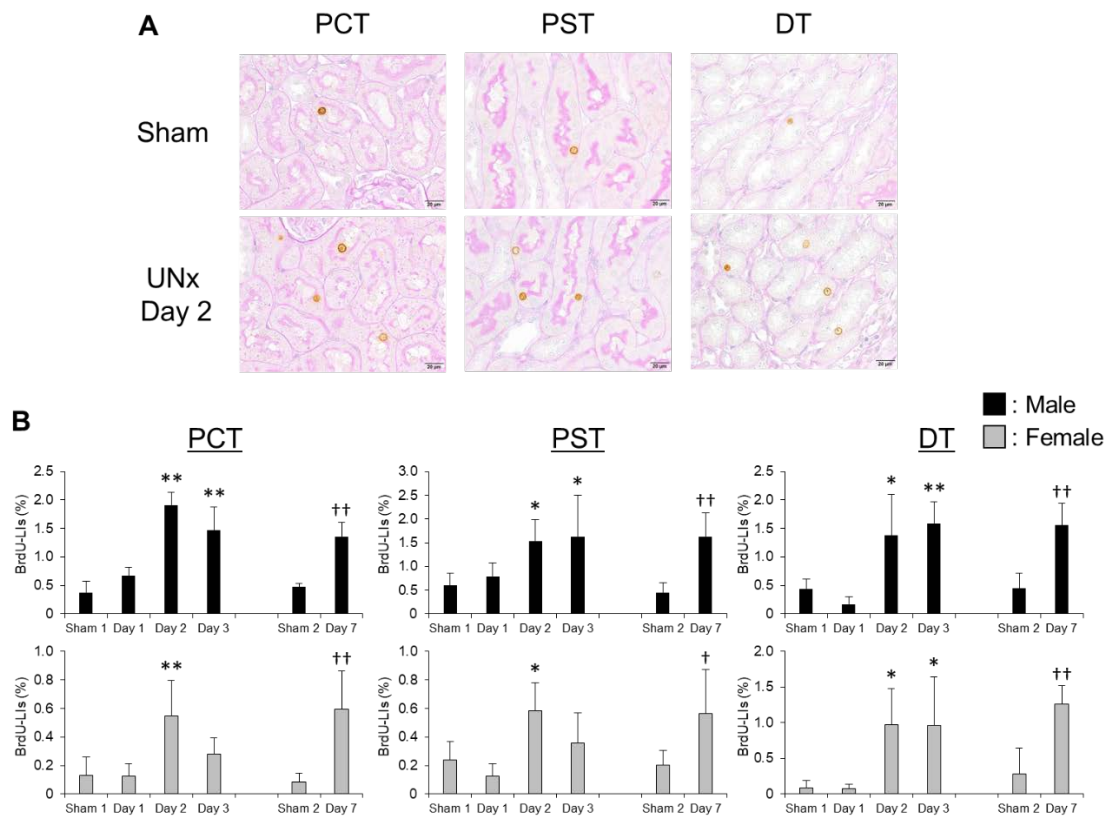
該当なし

**Table 1.** 片側腎摘出後の残存腎における Upstream Regulator Analysis

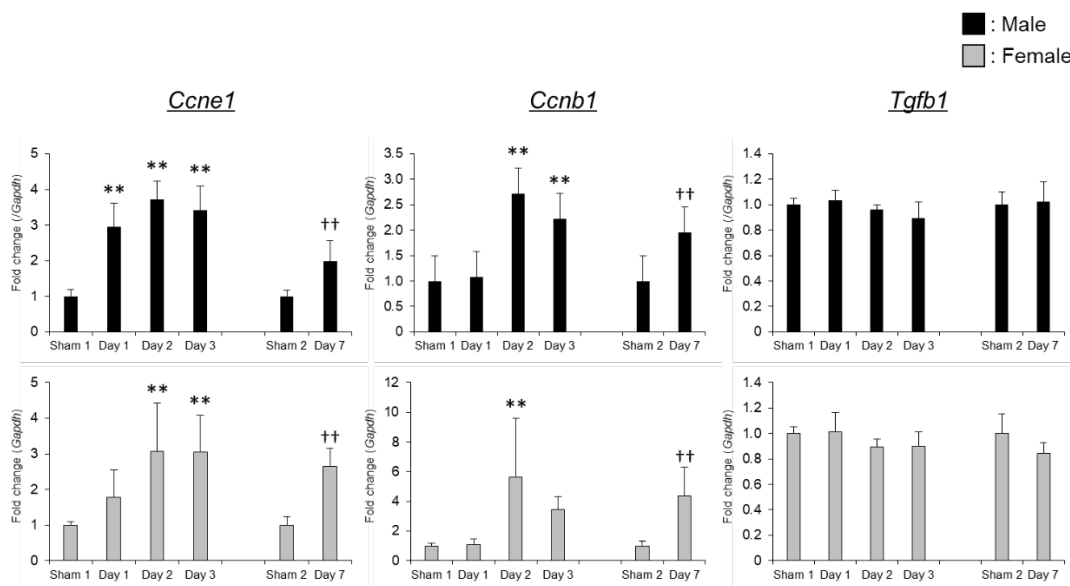
Upstream Regulator	Fold Change	Activation z-score	p-value of overlap
FOXO1	2.177	4.699	2.75E-25
E2F1	4.039	3.785	3.46E-21
MYBL2	2.887	3.107	9.04E-13

**Table 2.** 片側腎摘出後の残存腎における miRNA マイクロアレイ

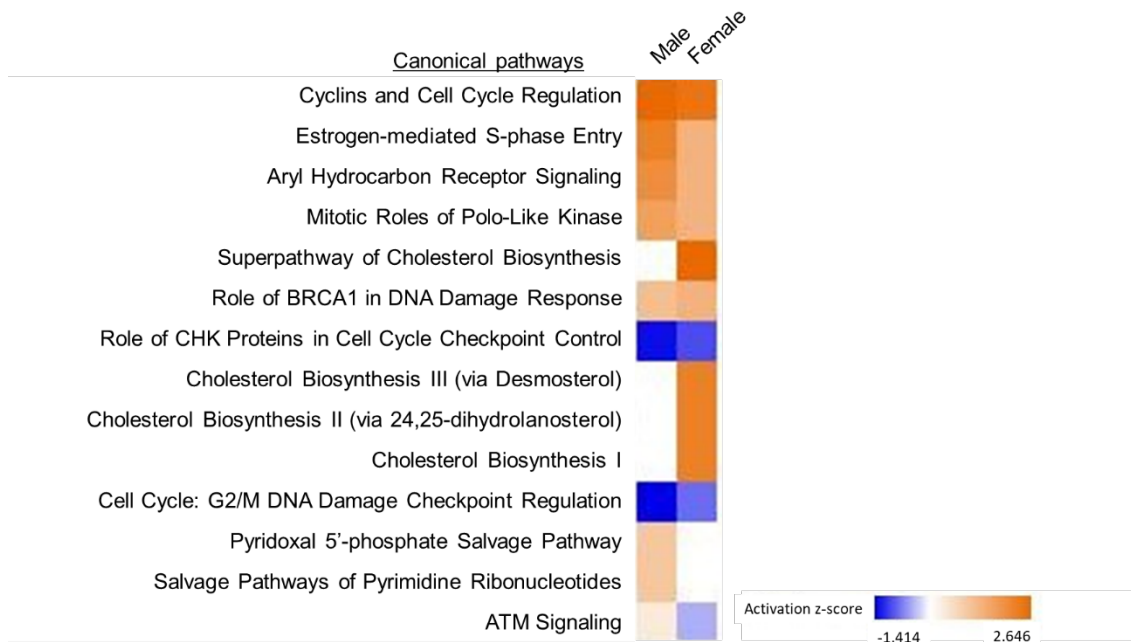
Name	Fold change	<i>p</i> value	miRBase accession No.
rno-miR-340-5p	-76.3	4.6E-13	MIMAT0004650
rno-miR-1843a-5p	-37.3	7.9E-11	MIMAT0024847
rno-miR-450b-5p	-37.4	2.8E-11	MIMAT0035746
rno-miR-653-5p	-34.1	8.4E-13	MIMAT0012838
rno-miR-9-3p	-15.8	1.3E-02	MIMAT0004708
rno-miR-1843b-3p	-15.2	1.7E-02	MIMAT0035731
rno-miR-31-5p	-14.1	1.3E-02	MIMAT0000810
rno-miR-221-3p	-13.7	1.6E-02	MIMAT0000891
rno-miR-194-3p	-13.2	1.4E-02	MIMAT0017148



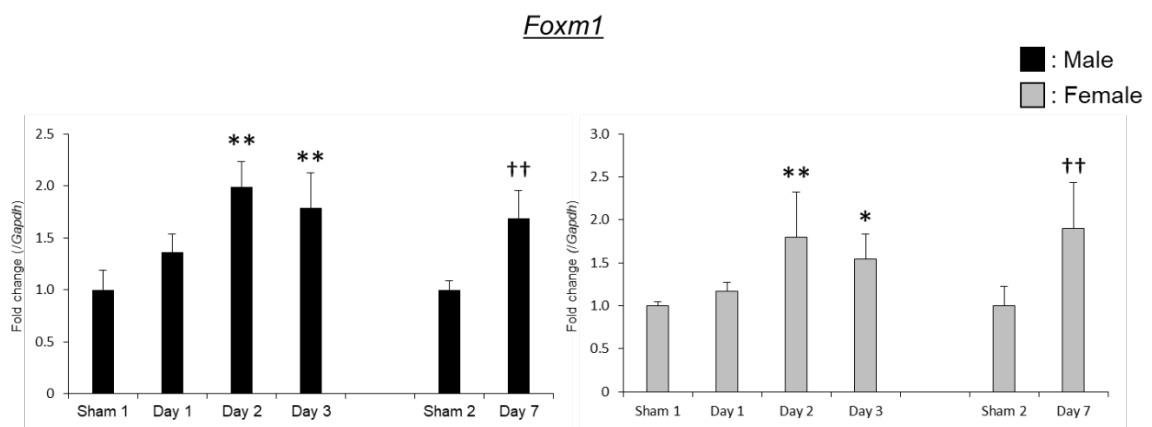
**Figure 1.** 片側腎摘出 (UNx) 後の残存腎の近位尿細管曲部 (PCT) , 近位尿細管直部 (PCT) および遠位尿細管 (DT) における BrdU 免疫染色 (A) および BrdU 陽性細胞率 (B) .



**Figure 2.** 片側腎摘出後の残存腎における Cyclin E1 (*Ccne1*) , Cyclin B1 (*Ccnb1*) および TGF-β1 (*Ggfb1*) の mRNA 発現解析.

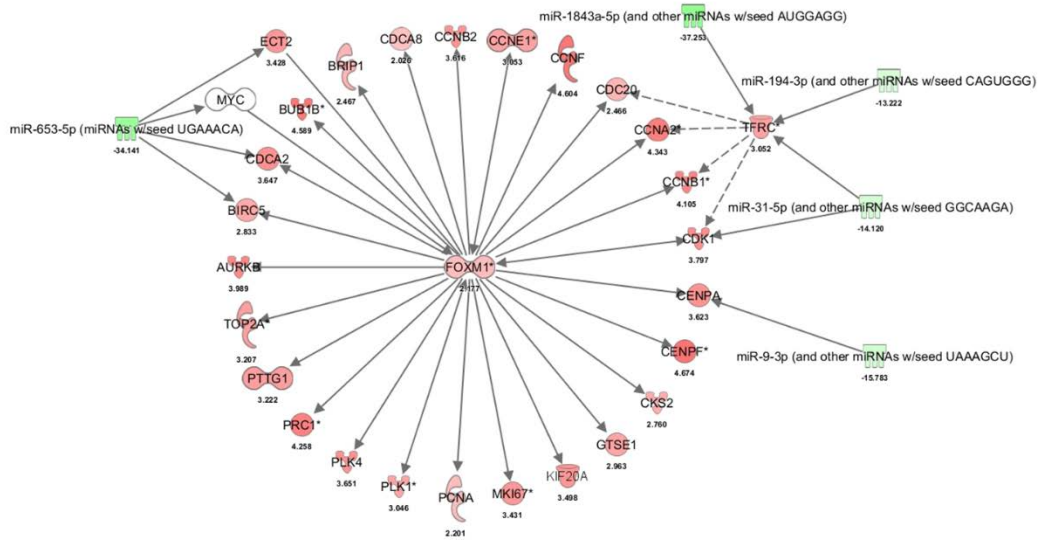


**Figure 3.** 片側腎摘出後の残存腎における mRNA マイクロアレイデータを用いた New Comparison Analysis.

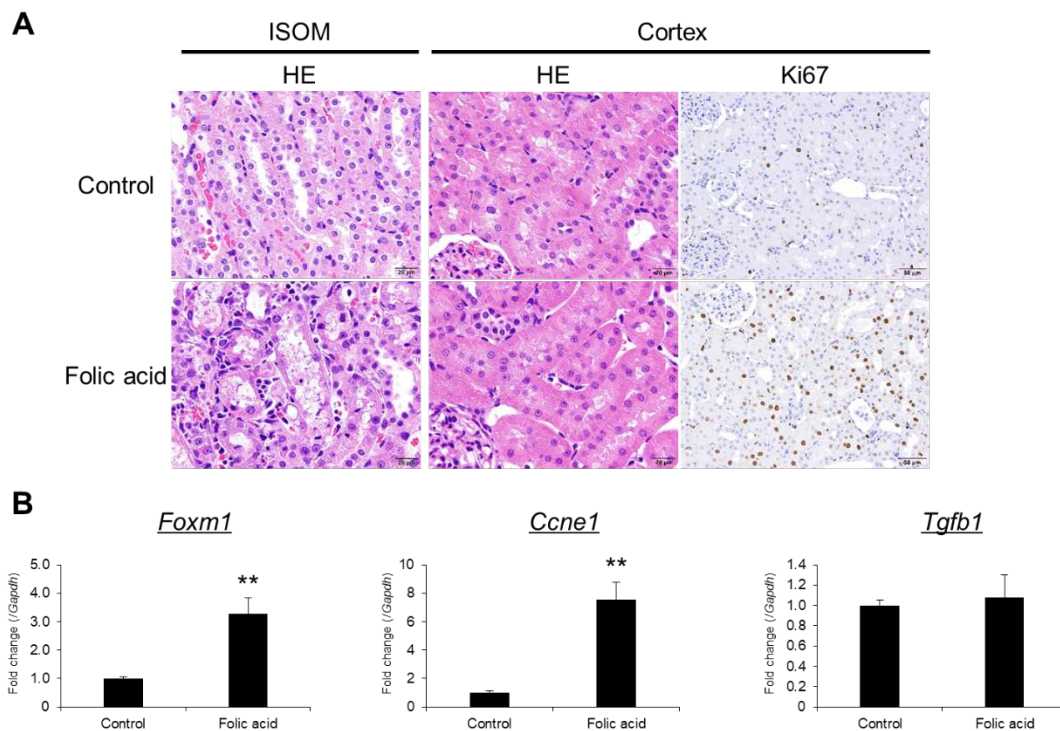


**Figure 4.** 片側腎摘出後の残存腎における FOXM1 の mRNA 発現解析.





**Figure 5.** 片側腎摘出後の残存腎における mRNA-miRNA 統合解析



**Figure 6.** Folic acid 投与ラット腎臓における髄質外層内帯 (ISOM) および皮質における病理組織学的解析および Ki67 免疫染色 (A) ならびに皮質における FOXM1 (*Foxm1*), Cyclin E1 (*Ccne1*) および TGF-β1 (*Ggfb1*) の mRNA 発現解析