

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 2 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。有害性発現経路(AOP: Adverse Outcome Pathway)開発プログラムにおいて、代償性反応に関する情報は各 KE(Key Event)間の関連性を理解するために有用であるとされているため、代償性メカニズムの解明は今後の安全性研究において重要になると考えられる。腎臓は化学物質による毒性の主要な標的臓器であり、代償性反応としては 2 つの機構が存在し、障害部位で生じる尿細管再生及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、本年度は障害部位で生じる尿細管の再生機構及びその破綻に関わる因子を探索した。

10 週齢の雌性 F344 ラットの左腎臓に 90 分及び 120 分の虚血再灌流 (I/R) 処置を施し、それぞれ 3 日及び 7 日後に剖検して急性腎障害モデルラットを作製した。病理組織学的解析では、3 日及び 7 日後にそれぞれ再生初期及び再生後期の尿細管が認められ、さらに拡張した尿細管も両時点で観察された。免疫組織学的解析では、再生初期の尿細管に survivin 及び SOX9 発現の上昇が認められ、拡張尿細管に CD44 の発現が確認された。また 6 週齢の雄性 SD ラットの左腎臓に 60 分の I/R 処置を施して 10 日後に剖検し、腎線維化モデルラットを作製した。線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、SOX9 及び CD44 に高率に陽性を示した。

以上より、survivin 及び SOX9 は尿細管の再生機構に関与するが、SOX9 の過剰あるいは持続的な発現は線維化と関連することが示唆された。CD44 は再生機構の破綻した尿細管に特異的に発現していることが示唆され、またその発現は尿細管障害の直後からみられることが明らかとなった。これらの情報は腎臓の代償性メカニズムの理解に役立つものと考えられる。また尿細管の再生機構が破綻した場合、線維化が生じて病態が不可逆的になることが知られている。よって、本研究により得られた結果は、尿細管の再生機構破綻を KE、CD44 を腎障害の可逆性の予測指標とした腎線維化の AOP 開発に貢献できるものと期待される。

A. 研究目的

代償性反応は外来物質の暴露に対し、恒常性の維持のために種々の臓器において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。OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) によるAOP (Adverse Outcome Pathway) 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KE (Key Event) 間の関連性を理解するために有用であり、KER (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メカニズムの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。

前年度までの研究において、非障害ネフロンにおける代償性反応の分子機構の一端を明らかにするため、片側腎摘出モデルラットにおいて、mRNA及びmicro (mi)RNAの発現をマイクロアレイにより網羅的に解析して、mRNA-miRNA統合解析を実施した。さらに障害ネフロン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、候補因子としてsurvivin、SOX9及びCD44を抽出した (Table 1)。

本年度では前年度に引き続き、抽出した候補因子の再生尿細管における発現動態を検索した。さらに腎線維化モデルラットを作製し、各因子の線維化病変内の尿細管における発現を解析した。

B. 研究方法

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。先行研究の概要を以下に簡潔に示す。10週齢の雌性F344ラットの左腎臓に90分あるいは120分の虚血処置を施し、再灌流後それぞれ3及び7日に剖検した。対照群にはSham処置を施し、7日後に剖検した。剖検時に左腎臓の一部を10%中性緩衝ホルマリンに固定し、残りの組織をOCTコンパウンドにて凍結包埋した。ホルマリン固定組織を定法に従いパラフィン包埋、薄切し、病理組織学的解析に供した。その結果、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、凍結標本を作製して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より採取した正常尿細管と比較した。

本研究では、上記の先行研究により得られたホルマリン固定・パラフィン包埋した腎組織を用い、HE染色、Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色及びシリウスレッド染色を実施して急性腎障害が生じた後の尿細管の形態を詳細に解析するとともに、各種の免疫染色を実施した。

さらに腎線維化モデルラットを作製するために6週齢の雄性SDラットの左腎臓に60分の虚血処置あるいはSham処置を施し、10

日後に剖検した。剖検時に左腎臓を採材し、同様に病理組織学的解析及び免疫組織学的解析に供した。

免疫組織学的解析のため、パラフィン包埋・薄切した標本を用い、抗原賦活化処置としてクエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬してオートクレーブ処置 (121°C、15分) した。さらに3% H₂O₂/MeOHに浸漬して内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、非特異反応をブロッキングするため10%正常ヤギ血清を室温で30分インキュベートした。引き続き抗 survivin 抗体 (71G4B7, x3000, Cell Signaling Technology)、抗 SOX9 抗体 (EPR14335, x2000, Abcam)、抗CD44抗体 (ポリクローナル, x10000, Abcam)、抗p21抗体 (SXM30, x100, Becton Dickinson) あるいは抗 α -SMA抗体 (M0851, x50, Agilent) を4°Cにて1晩インキュベートした。二次抗体反応として、survivinはABC法 (VectaStain Elite ABC Kit, Vector Laboratories)、その他の抗体はポリマー法 (ヒストファイニンシンプルステイン、ニチレイ) を用い、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorideにより反応を可視化した。急性腎障害モデルラット及び腎線維化モデルラット腎臓の皮質及び髄質外帯外層における尿細管の核を1000個以上カウントし、survivin、SOX9及びp21の陽性細胞 (核) 率を算出し、さらに細胞膜がCD44陽性を示す尿細管の数をカウントして単位面積当たりのCD44陽性尿細管数を求めた。

また、急性腎障害モデルラット (虚血再灌流処置3日後) におけるCD44とp21の局在を解析するため、以下の方法で蛍光二重免疫染色を実施した。上記と同様に抗原賦活化処置及びブロッキング処置を施し、抗p21抗体 (x100) を4°Cにて1晩インキュベートした後、二次抗体 (x100, Alexa Fluor 647-

conjugated anti-mouse secondary antibody, Abcam) を室温で2時間インキュベートした。引き続き、抗CD44抗体 (x5000) を37°Cで1時間インキュベートした後、二次抗体 (x1000, Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibody, Abcam) を室温で2時間インキュベートした。Vector True VIEW (Vector Laboratories)により自家蛍光の軽減処置をした後、Vecta Shield Hard Set Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)にて封入し、All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X710 (Keyence Corporation)により観察した。

(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

急性腎障害モデルラット腎臓において、シリウスレッド染色及び α -SMA免疫染色により、線維化は生じていないことを確認した。病理組織学的解析の結果、先行研究と一致して虚血再灌流処置の3及び7日後にそれぞれ再生初期及び再生後期の再生尿細管が多数観察された。PAS染色標本では、再生初期の尿細管では近位尿細管の固有の構造であるPAS陽性を示す刷子縁は観察されなかったことに対し、再生後期の尿細管では刷子縁が不完全ながら形成されていた。さらに詳細に病理標本を観察した結果、再生尿細管に加えて扁平な上皮からなる拡張尿細管が虚血再灌流の3及び7日後に観察された。これらの拡張尿細管はいずれの時点においても刷子縁を欠いていた。

免疫染色の結果、正常尿細管と比較して survivin及びSOX9は虚血再灌流3日後の再

生初期の尿細管で高率に発現しており、その発現は7日後の再生後期の尿細管においては減少していた (Figure 1A及びB)。CD44は正常尿細管及び再生尿細管ではほとんど発現が認められなかったことに対し、虚血再灌流3及び7日後の拡張尿細管に明らかな発現を認めた (Figure 1C)。p21の免疫染色では、虚血再灌流3日後の拡張尿細管が高率に陽性を示した (Figure 1D)。また虚血再灌流3日後における蛍光二重免疫染色では、CD44及びp21が高率に共発現していることが示された (Figure 1E)。

腎線維化モデルラットにおいて、シリウスレッド染色及び α -SMA免疫染色により線維化病変が形成されていることを確認した。線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、共にPAS陽性の刷子縁は観察されなかった。これらの尿細管におけるsurvivinの陽性率は対照群の正常尿細管と比較して差は認められなかったことに対し (Figure 2A)、SOX9の陽性率は増加していた (Figure 2B)。また、これらの拡張/萎縮尿細管は高率にCD44陽性を示した (Figure 2C)。

D. 考察

尿細管の再生は壊死した尿細管上皮に隣接した上皮が脱分化して遊走・増殖し、その後正常な尿細管上皮に再分化するという一連の過程を経て行われる。この尿細管再生が正常に機能した場合、腎組織は機能的及び形態的に修復される。一方、この再生機構が何らかの理由で破綻した場合、不可逆的な線維化が生じて病変が慢性化することが知られている。再生過程の尿細管の形態は比較的良好に知られており、毒性病理学分野においては'tubular regeneration'として INHAND (International Harmonization of

Nomenclature and Diagnostic Criteria) に所見が記されている。一方、再生機構の破綻した尿細管の形態学的特徴等は明らかではない。よって、再生機構の破綻した尿細管の形態学的特徴を明らかにするとともに、正常尿細管及び再生尿細管と峻別するマーカーを見出すことができれば、腎障害の可逆性を予測する新規評価分子の開発に繋がることが期待される。

本研究において、急性腎障害モデルラットに観察された再生尿細管は、虚血再灌流処置3から7日後にかけて刷子縁の発達が認められたことから、正常に再生・再分化していることが示された。一方、急性腎障害モデルラットにみられた拡張した尿細管には刷子縁が認められなかったことから、再分化能を欠く尿細管である可能性が考えられた。腎線維化モデルラットでは、腎線維化病変における尿細管は拡張あるいは萎縮していた。よって、再生機構の破綻した尿細管の形態学的特徴は拡張あるいは萎縮であることが示唆された。

免疫組織学的解析では、急性腎障害モデルラットにみられた再生尿細管においてsurvivin及びSOX9の発現が一過性に上昇し、再分化とともにそれらの発現は減少した。一方、腎線維化モデルラットにおいて、線維化病変内の拡張/萎縮尿細管にsurvivinの発現はほとんど認められなかったことに対し、SOX9は高率に陽性を示した。よって、survivin及びSOX9は尿細管の再生機構に関与していること、さらにSOX9の過剰・持続的な発現は線維化と関連するということが示唆された。

急性腎障害モデルラットにおいて、CD44は再生尿細管にはほとんど発現が認められなかったことに対し、拡張した尿細管に発現していた。また、腎線維化モデルラットに

において、CD44は線維化病変内の拡張/萎縮尿管に明らかな発現が認められた。さらにCD44は虚血再灌流処置3日後の拡張尿管においてp21と高率に共発現していた。これまでに、尿管障害後のp21の発現により、G1/S及びG2/M arrestが生じて細胞周期が停止し、不可逆的な細胞老化に至るという報告や、p21欠損マウスでは野生型マウスと比較して腎障害後の線維化病変の形成が軽減されるといった報告がなされている。よって、p21は腎線維化に対して促進作用を示すことが考えられる。本研究においては、CD44は拡張した尿管においてp21と高率に共発現していたこと、さらに線維化病変内の尿管に発現していたことから、再生機構の破綻した尿管に特異的に発現していることが示唆され、またその発現は尿管傷害の直後からみられることが明らかとなった。

E. 結論

本研究により、survivin及びSOX9は尿管の再生機構に関わるが、SOX9の過剰あるいは持続的な発現は腎線維化と関連することが示唆された。またCD44は再生機構の破綻した尿管に特異的に発現しており、その発現は障害直後からみられることが明らかとなった。本研究により得られた成果は、腎臓の代償性メカニズムの理解に役立つと考えられる。さらに尿管の再生機構破綻をKE、CD44を腎障害の可逆性の予測指標とした腎線維化のAOP開発にも貢献できるものと期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression

of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *Journal of Applied Toxicology*. 2021, 41(4), 607-617, doi: 10.1002/jat.4069.

- 2) 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*. 2020; 40(10): 1373-1383. doi: 10.1002/jat.3990.

F.2. 学会発表

- 1) 松下幸平, 豊田武士, 山田貴宣, 森川朋美, 小川久美子. mRNA-microRNA統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第48回日本毒性学会学術集会. 2020年6月.
- 2) 松下幸平. 腎障害の慢性化メカニズムに関する研究: 安全性評価への応用を目指して (招待講演). 第3回医薬品毒性機序研究会. 2021年1月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1. 急性腎障害モデルラットの再生尿細管における Survivin, SOX9 及び CD44 の mRNA 発現

遺伝子	蛋白	mRNA 発現 (/正常尿細管)		機能
		I/R 処置 3 日後	I/R 処置 7 日後	
<i>Birc5</i>	Survivin	x7.8	x1.7	抗アポトーシス及び細胞分裂(Mita et al., 2008)
<i>Sox9</i>	SOX9	x6.0	x4.9	尿細管の発生に寄与 (Little and Kairath, 2017)
<i>Cd44</i>	CD44	x2.9	x2.0	ヒアルロン酸レセプター (Jordan et al., 2015)

I/R: Ischemia/reperfusion, SOX9: sex-determining region Y (SR Y)-box 9

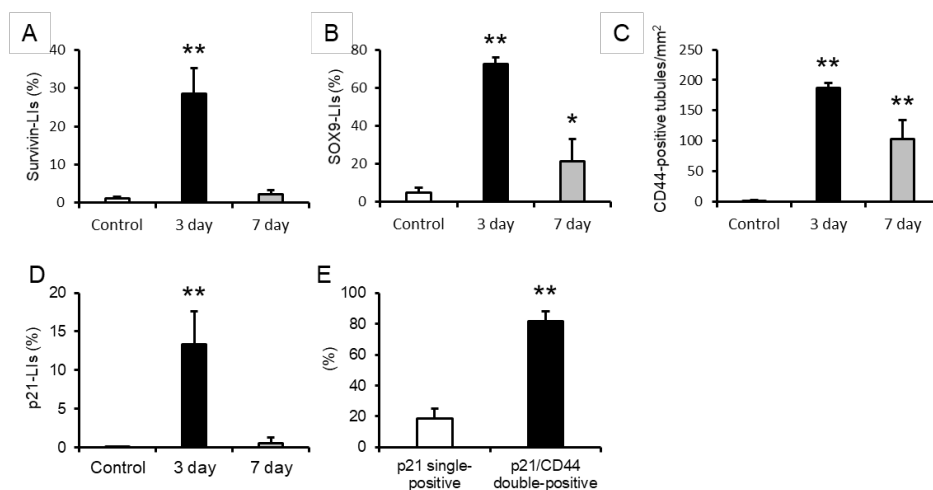


Figure 1. 急性腎障害モデルラットにおける虚血再灌流処置 3 及び 7 日後の survivin (A), SOX9 (B), CD44 (C) 及び p21 (D) の発現ならびに処置 3 日後の p21 及び CD44 の局在解析. *, **: $P < 0.05, 0.01$. LIs: Labeling Indices.

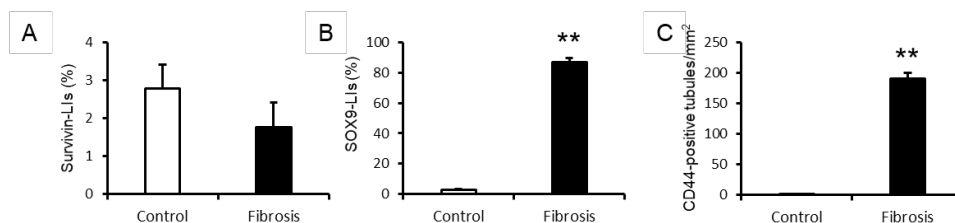


Figure 2. 腎線維化モデルラットの線維化病変内の尿細管における survivin (A), SOX9 (B) 及び CD44 (C) の発現. **: $P < 0.01$. LIs: Labeling Indices.