

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プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3年度 分担研究報告書

腎障害・線維化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**

腎障害が生じた後に尿細管の再生機構が破綻した場合、不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。これまでの研究により、我々は腎虚血再灌流障害モデルラットにおいて再生機構の破綻した尿細管には CD44 が発現する可能性を明らかにしており、尿細管の再生機構破綻を Key Event、CD44 発現をエンドポイントとした腎障害・腎線維化の AOP 開発の可能性を見出している。本研究では、CD44 のエンドポイントとしての汎用性を検証するため、障害機序の異なる 3 種類の腎障害物質をラットに投与して CD44 発現を病理組織学的に解析した。

アロプリノール及びバンコマイシンを投与したラット腎臓では線維化領域の増加が認められた。線維化病変の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、これらの尿細管は CD44 に陽性を示した。一方、ピューロマイシンを投与したラット腎臓においては、尿細管障害は認められたものの線維化病変及び CD44 陽性尿細管は確認されなかった。これらの結果は、CD44 は線維化病変内の再生機構の破綻した尿細管に発現することを示唆するものであり、さらに再生機構の破綻を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP における CD44 のエンドポイントとしての汎用性を支持するものと考えられた。

**A. 研究目的**

腎障害が生じた後に尿細管の再生機構が破綻した場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで尿細管の再生機構破綻を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP 作製に資するデータを得ることを目的とし、研究を行ってきた。そのなかで、腎虚血再灌流障害モデルラットの腎臓では再生機構の破綻した尿細管において CD44 が発現している可能性を明らかにした（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）。よって、

CD44 を測定可能なエンドポイントとした AOP 開発の可能性を見出した。

本研究では再生機構の破綻した尿細管において発現する CD44 のエンドポイントとしての汎用性を検証するため、障害機序の異なる 3 種類の腎障害物質を用いて腎障害・腎線維化モデルラットを作製し、CD44 の発現を検索した。

**B. 研究方法**

実験 1:6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に配し (n=5)、媒体である 0.5%メチルセルロースもしくはアロプリノール (APL) を 100 及び 150 mg/kg 体重 (5 mL/kg 体重) の用量

で1日1回、28日間反復強制経口投与した。体重測定を週に1回行い、最新体重に基づいて投与容量を算出した。最終投与1日後にイソフルラン深麻酔下において腹大動脈から採血した後、放血により安楽死させて剖検を行った。剖検時に腎臓を摘出して重量を測定した後、一部を10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、残りの組織は液体窒素にて瞬間凍結もしくは OCT コンパウンドにて凍結ブロックを作製して-80°Cにて保存した。得られた血液サンプルを常温下で遠心(3000rpm、15分)して血清を分離し、尿素窒素(BUN)及びクレアチニン(sCre)の値を測定した。また、10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎臓組織を用いて定法に従いパラフィン包埋、薄切し、HE染色及び膠原線維を赤色に染色するシリウスレッド染色を施して病理組織学的検索を行った。さらに免疫組織学的解析のため、組織標本を抗原賦活化処置としてクエン酸バッファ(pH6.0)に浸漬してオートクレーブ処置し(121°C、15分)、3% $H_2O_2$ /メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを除去した。引き続き、非特異反応を除去するため10%正常ヤギ血清を用いてブロッキング処置を施した後、抗CD44抗体(ポリクローナル, x10000, Abcam)を4°Cにて一晩インキュベートし、二次抗体(ポリマー法: ヒストファインシンプルステイン)を室温下で30分インキュベートした。ジアミノベンジジンにて反応を可視化し、ヘマトキシリンにより核染色を行った。統計学的解析として、体重、血液生化学的検査及び腎重量のデータについて一元配置分散分析(ANOVA)を実施した後にDunnnett法による多重検定を行った。有意水準は0.05に設定した。

**実験2:**6週齢の雄性SDラットを3群に配し(n=5)、媒体である生理食塩水もしくはバンコマイシン(VAN)を200及び400mg/kg体重(10mL/kg体重)の用量で1日1回、28日間反復腹腔内投与し、実験1と同様の測定及び解析を実施した。

**実験3:**6週齢の雄性SDラットを3群に配し(n=5)、媒体である生理食塩水もしくはピューロマイシン(PAN)を8及び12mg/kg体重(5mL/kg体重)の用量で1日1回、28日間反復静脈内投与し、実験1及び2と同様の測定及び解析を行った。

(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

**実験1:**実験結果を図1に示す。APL投与群では実験期間を通して体重増加抑制が認められ、APL100mg/kg群では実験開始1から2週後に、APL150mg/kg群では実験開始1から4週後にかけて対照群と比較して有意な低値を示した。血清生化学的検査では、BUN及びsCreともにAPL100mg/kg群から増加傾向を示し、APL150mg/kg群では有意な増加を認めた。腎重量の測定では、APL100及び150mg/kg群ともに絶対及び相対重量が用量依存性を伴って有意に増加した。病理組織標本を用いたシリウスレッド染色による線維化の評価では、APL100及び150mg/kg群ともに間質の膠原線維の明らかな増加を認めた。膠原線維の増加した領域では尿細管は拡張あるいは萎縮しており、これらの尿細管

は免疫染色にて CD44 陽性を示した。

**実験 2**：実験結果を図 2 に示す。体重測定において VAN 投与の影響は認められなかった。血清生化学的検査では、BUN の有意な高値が VAN 200 及び 400 mg/kg 群に、sCre の有意な高値が VAN 400 mg/kg 群に認められた。腎重量測定では、VAN 400 mg/kg 群において絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。シリウスレッド染色では VAN 200 及び 400 mg/kg 群ともに軽度な膠原線維の増加が認められ、膠原線維の増加した領域における尿細管は拡張あるいは萎縮しており、免疫染色にて CD44 陽性を示した。

**実験 3**：実験結果を図 3 に示す。体重測定において PAN 投与の影響は認められなかった。血清生化学的検査では、PAN 12 mg/kg 群において BUN の有意な低値が認められた。腎重量測定では、PAN 12 mg/kg 群において相対重量の有意な増加が認められた。PAN 8 及び 12 mg/kg 群の腎臓では糸球体及び尿細管障害を示唆する変化がみられたものの、シリウスレッドによる線維化の評価において間質の膠原線維の明らかな増加は認められず、拡張/萎縮尿細管も観察されなかった。また CD44 の免疫染色においても、陽性を示す尿細管は認められなかった。

#### D. 考察

APL 投与ラット腎臓においては広範な線維化病変が認められ、病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。この線維化病変内の尿細管の形態学的な特徴は虚血再灌流障害による腎線維化モデルラットでみられたものと一致していた (Matsushita K. et al., J. Appl. Toxicol. 2021; 41(4): 607-617)。

この拡張/萎縮尿細管は免疫染色において CD44 に明らかな陽性を示した。VAN 投与ラット腎臓においても軽度な線維化が認められた。APL 投与ラット腎臓と同様に、VAN 投与ラット腎臓においても線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、CD44 の発現が認められた。PAN 投与ラットの腎臓では、典型病変である糸球体障害及びそれに続発するとされる尿細管障害が認められたものの、間質の膠原線維の明らかな増加はみられず、拡張/萎縮尿細管も認められなかった。これらの結果は PAN 投与ラット腎臓では尿細管障害が生じているものの、その再生機構は破綻していないことを示唆していると考えられた。また、PAN 投与ラット腎臓では CD44 陽性尿細管は認められなかった。

以上の結果は、CD44 は線維化病変内の再生機構の破綻した尿細管に発現するというを示唆するものであり、さらに CD44 の測定可能なエンドポイントとしての汎用性を支持するものと考えられた。

#### E. 結論

本研究結果は、CD44 は再生機構の破綻した尿細管に発現することを示唆しており、さらに尿細管の再生機構破綻を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP における CD44 の測定可能なエンドポイントとしての汎用性を支持するものと考えられた。

#### F. 研究発表

##### F.1. 論文発表

1. [Matsushita K](#), Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. Arch. Toxicol. 2021; 95(9): 3117-3131.

## F.2 学会発表

1. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証. 第 38 回日本毒性病理学会. 2022.01.27.
2. 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジンおよびオルト-アニジシン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響. 第 38 回日本毒性病理学会. 2022.01.27.
3. 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較. 第 38 回日本毒性病理学会. 2022.01.27.
4. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第 4 回医薬品毒性機序研究会. 2021.12.16.
5. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021. 09. 07.
6. 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 第 50 回日本環境変異原ゲノム学会. 2021.11.01.
7. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現. 第 48 回日本毒性学会学術集会. 2021. 07. 07.
8. 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法. 第 48 回日本毒性学会学術集会. 2021. 07. 07.
9. 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子. ラットを用いたヘム鉄の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 第 27 回日本食品化学学会学術大会. 2021. 06. 10.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

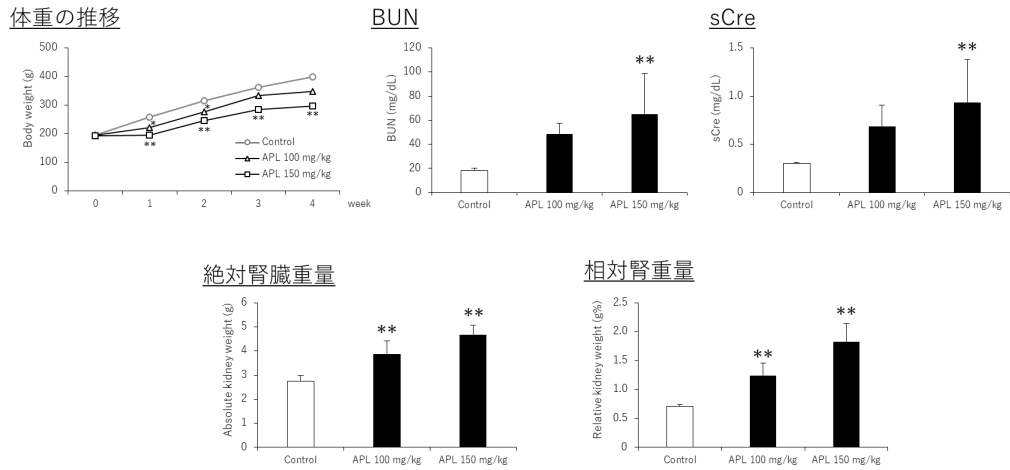


図1. アロプリノール (APL) 投与ラットにおける体重の推移、血中尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (sCre) 及び腎重量。  
\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. Control.

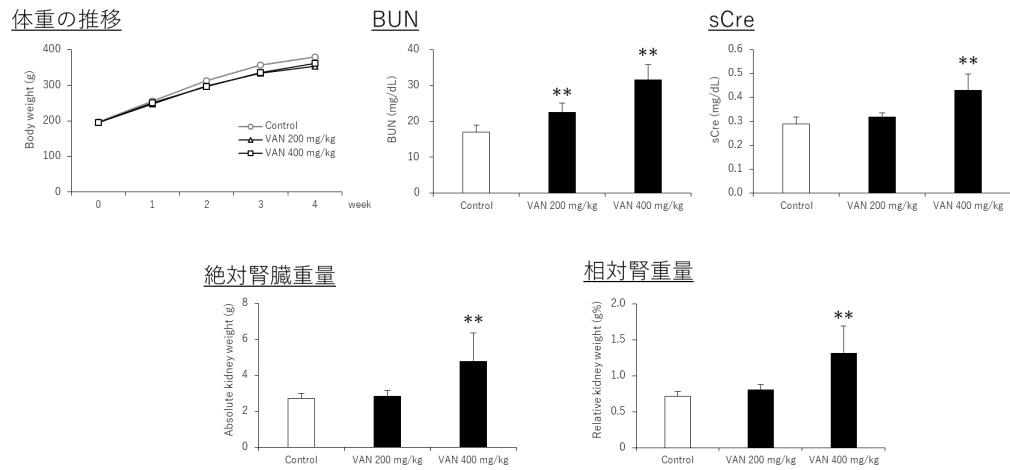


図2. パンコマイシン (VAN) 投与ラットにおける体重の推移、血中尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (sCre) 及び腎重量。  
\*\*:  $p < 0.01$  vs. Control.

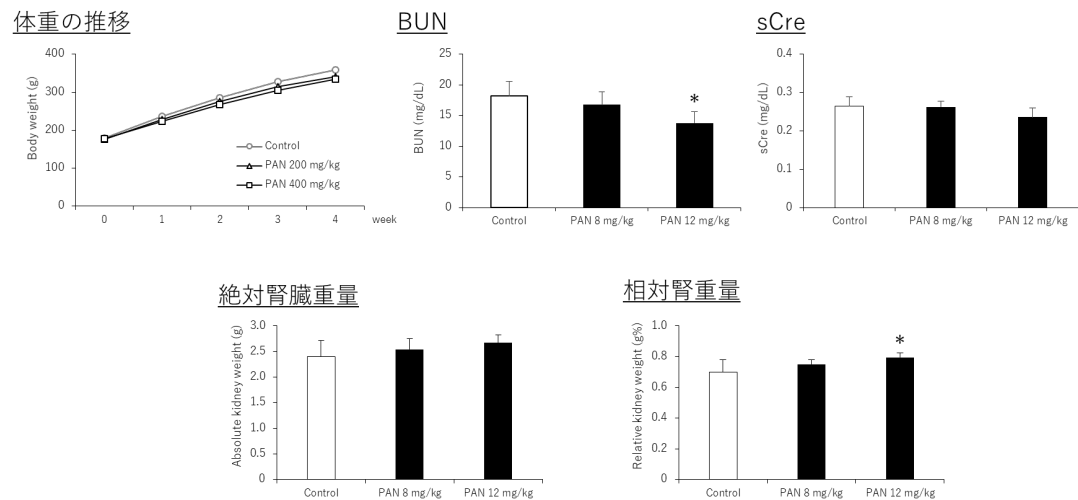


図3. ビューロマイシン (PAN) 投与ラットにおける体重の推移及び腎重量。\*:  $p < 0.05$  vs. Control.