

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4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異常が生じた場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで再生異常の生じた尿細管には CD44 が発現することを明らかにしており、尿細管の再生異常を Key Event、CD44 を測定可能なエンドポイントとした腎障害・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て研究を進めている。本年度はアロプリノール（APL）誘発腎線維化モデルラットを用いて CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性を検証した。

6週齢の雄性 SD ラットに 0、100 及び 150 mg/kg の APL を 28 日間反復強制経口投与した。100 及び 150 mg/kg 群において腎線維化が認められ、線維化病変の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。免疫染色にて拡張/萎縮尿細管は CD44 に陽性を示し、近位尿細管の分化マーカーの発現減少及び間葉系マーカーの発現が認められ、基底膜に囲まれていた。拡張/萎縮尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取してマイクロアレイを行い、パスウェイ解析を実施した結果、CD44 は fibronectin 1 (*Fnl*) を含む線維化関連遺伝子の上流因子として抽出された。*in situ hybridization* では *Fnl* mRNA は拡張/萎縮尿細管の細胞質に確認されたが、免疫染色において fibronectin はこれらの尿細管の周囲間質に認められた。また APL 投与群では尿及び血清中の CD44 発現が上昇していた。

尿細管が基底膜に接着した状態で間葉系の表現型を獲得する現象を部分的上皮間葉転換 (pEMT) という。本実験結果から CD44 は pEMT の生じた尿細管において細胞外基質の分泌を誘導すると考えられた。また CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。これらの結果は尿細管の再生異常を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP における CD44 の測定項目としての妥当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異常が生じた場合、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異常を 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異常の生じた尿細管において 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)。この結果から、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。

昨年度は再生異常の生じ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。本年度はそのなかで強い線維化を誘発することのできたアロプリノール (APL) 誘発腎線維化モデルラットを用いて CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性を検証した。

## B. 研究方法

昨年度に実施した動物実験により得られた腎臓、血清及び尿サンプルを用いて解析を行った。その動物実験の概要及び解析方法を以下に示す。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 APL を 100 及び 150 mg/kg の用量で 28 日間反復強制経口投与した。最終投与日に全例を代謝ケージに移し、解析用サンプルとして 4 時間採尿した後、さらに 20 時間採尿して尿量を測定した。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。得られた血液サンプルを常温下で遠心して血清を分離した。剖検時に腎臓の一部を 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。

全群について 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 (4 µm) 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。免疫組織学的解析により CD44、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)、aquaporin1 (AQP1)、N-cadherin、vimentin、collagen type IV、nidogen-1 及び fibronectin の発現を解析した。また CD44 と各種因子の局在を解析するため二重蛍光免疫染色を行った。同一宿主の 2 種類の抗体を用いる場合は、チラミッドシグナル増幅法により染色を実施した。さらに fibronectin1 (*Fnl*) の mRNA の局在を *in situ* hybridization 法により解析した。

また対照群及び 30 mg/kg 群の凍結ブロックを薄切 (16 µm) し、on ice で迅速 HE 染色を施した。対照群の正常尿細管及び 30 mg/kg の線維化病変内の尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取した。得られたサンプルから total RNA を抽出して増幅処置を行い、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。正常尿細管と比較して 30 mg/kg 群の線維化病変内の尿細管において発現の変動していた遺伝子群を抽出し、Gene ontology (GO) 解析及び Ingenuity® Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。

尿中タンパクを精製及び濃縮した後、ウエスタンブロッティング法により CD44 発現を解析した。また ELISA 法により血清中 CD44 値を測定した。また瞬間凍結した腎臓組織から total RNA を抽出し、total CD44 及び CD44 standard isoform に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現量を解析した。

統計学的解析として、各データについて一元配置分散分析 (ANOVA) を実施した後、Dunnett 法による多重検定を行った。また 2 つの因子の相関関係を解析するためスピアマンの順位相関係数を求めた。有意水準は 0.05 に設定した。

(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

シリウスレッド染色及び  $\alpha$ SMA 免疫染色では、それぞれの陽性面積が APL 投与群では対照群と比較して有意に増加していた (図 1A 及び B)。HE 染色標本を用いた病理組織学的解析において、APL 投与群における線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。免疫組織学的解析ではこれらの尿細管は CD44 に陽性を示し、APL 投与群の CD44 陽性尿細管は対照群と比較して有意に増加していた (図 1C)。また、CD44 陽性尿細管の数はシリウスレッド陽性面積及び  $\alpha$ SMA 陽性面積と正の相関を示した (図 1D 及び E)。蛍光二重免疫染色では、APL 投与群において CD44 陽性尿細管の周囲に  $\alpha$ SMA 陽性反応が確認された。

マイクロアレイでは、正常尿細管と比較して拡張/萎縮尿細管では 1462 遺伝子の発現が上昇しており、1484 遺伝子の発現が低下していた。GO 解析では、拡張/萎縮尿細管において細胞外基質に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、トランスポーター及び代謝といった尿細管の分化に関わる遺伝子群の発現が低下していた (図 2A)。パスウェイ解析では、CD44 は fibronectin の産生に関わる *Fnl* を含む線維化関連遺伝子群の発現を誘導していることが示された (図 2B)。

免疫染色により尿細管の分化マーカーの発現を検索した結果、拡張/萎縮尿細管では AQP1 及び N-cadherin の発現が減弱あるいは消失しており、これらの因子に陽性を

示す尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に減少していた (図 3A 及び B)。また AQP1 及び N-cadherin に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と負の相関を示した (図 3C 及び D)。蛍光二重免疫染色では、CD44 は AQP1 及び N-cadherin と排他的な発現を示した。間葉系マーカーの検索では、拡張/萎縮尿細管は vimentin 及び  $\alpha$ SMA に陽性を示し、それぞれの陽性尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加していた (図 4A 及び B)。また vimentin 及び  $\alpha$ SMA に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した (図 4C 及び D)。蛍光二重免疫染色では、CD44 は vimentin 及び  $\alpha$ SMA と同一の尿細管において発現していた。一方、基底膜マーカーである collagen type IV 及び nidogen-1 の免疫染色では、CD44 陽性を示す拡張/萎縮尿細管の周囲に軽度に肥厚した基底膜を認めた。

Fibronectin の免疫染色では拡張/萎縮尿細管の周囲間質に陽性反応が認められた。Fibronectin 陽性面積は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加しており、CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した (図 5A 及び B)。蛍光二重免疫染色では、CD44 陽性尿細管の周囲に fibronectin の陽性反応が認められた。一方 *in situ* hybridization において、*Fnl* mRNA の発現は間質の線維芽細胞に加えて APL 投与群の拡張/萎縮尿細管においても認められた。

ウエスタンブロッティング法による CD44 の発現解析では、腎臓組織中及び尿中に CD44 特異的なバンドが確認された (図 6A 及び B)。APL 投与群では対照群と比較して尿量の有意な増加を認めたことから (図 6C)、尿の濃縮は生じていないと考えられた。また ELISA 法による解析では、血清中 CD44 値が APL 投与群において

対照群と比較して有意に増加しており、血清中 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管数及びシリウスレッド陽性面積と正の相関を示した (図 6D、E 及び F)。また定量 PCR により APL 投与群では CD44 standard isoform が高発現していることが示された (図 6G 及び H)。

#### D. 考察

APL 投与群の線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、CD44 に陽性を示した。この結果は我々の腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた先行研究と一致しており (Matsushita et al., *J Appl Toxicol*, 2021)、CD44 は再生異常の生じた尿細管に発現するという仮説を支持するものと考えられた。

CD44 の機能の一端を明らかにする目的でマイクロアレイを実施した。その結果、GO 解析では拡張/萎縮尿細管は間葉系の表現型を獲得していることが示唆され、またパスウェイ解析では CD44 はこれらの尿細管において線維化に関連する遺伝子群の発現を誘導していることが示された。間葉系の表現型に関する因子をさらに詳細に検索するため、免疫染色及び *in situ* hybridization を実施した。その結果、APL 投与群の CD44 陽性を示す拡張/萎縮尿細管では近位尿細管の分化マーカーである AQP1 及び N-cadherin の発現が低下しており、間葉系マーカーである vimentin 及び  $\alpha$ SMA の発現が認められた。また *Fnl* の mRNA 発現は拡張/萎縮尿細管において亢進していたことに対し、fibronectin はこれらの尿細管周囲の間質に認められた。よって、拡張/萎縮尿細管は fibronectin を分泌しているものと考えられた。一方、CD44 陽性尿細管の周囲には明瞭な基底膜が観察された。

これまで上皮間葉転換 (EMT) の生じた尿細管は間質に遊走して筋線維芽細胞に分化すると考えられてきた。一方、近年の研究により尿細管が基底膜に接着した状態で間葉系の表現型を獲得する現象が明らかとなり、部分的上皮間葉転換 (pEMT) という新しい概念が提唱されるようになった。本実験結果から、CD44 は pEMT の生じた尿細管に発現し、細胞外基質の産生を誘導して腎線維化に寄与するものと考えられた。

ウエスタンブロッティング法及び ELISA の結果、APL 投与群の尿および血清中からも CD44 が検出された。定量 PCR の結果、腎臓に発現する CD44 は standard isoform であることが示された。CD44 standard isoform の分子量は約 82 kDa であるため、定量 PCR の結果はウエスタンブロッティング法により検出されたバンドの特異性を支持するものと考えられた。以上より、CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

今後は引き続き CD44 の機能解析およびバイオマーカーとしての可能性を検証するため、シクロスポリンによる腎線維化モデルラットの作製し、解析を進める予定である。

#### E. 結論

本研究により CD44 の腎線維化における役割の一端を明らかにすることができ、さらに腎線維化のバイオマーカーとなる可能性を示した。本結果は腎障害・腎線維化の AOP における尿細管の再生異常等の Key Event に対する CD44 の測定項目としての妥当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, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol*. In press.
2. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci*. 2022; 47: 457-466.
3. Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent  $\gamma$ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci*. 2022; 189: 51-61.
4. Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem Toxicol*. 2022; 168: 113365.
5. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci*. 2022; 47: 457-466.
6. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いた尿中 CD44 の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
7. 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. 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
8. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子.  $\gamma$ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
9. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
10. 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病変における CD44 陽性尿細管の病態生理学的意義, 第 5 回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.8, 東京)
11. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割と CD44 との関連. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
12. 水田保子, 赤木純一, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. デキストラ

### 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. AKI から CKD への移行における CD44 の役割とバイオマーカー

ン硫酸ナトリウム誘発ラット腸炎モデルにおけるナノポリスチレンの 28 日間反復経口投与毒性試験. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)

9. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
10. 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. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
11. 松下幸平. 薬剤性腎障害の可逆性を予測する新規バイオマーカーの探索. 日本薬学会第 143 年会. (2023.3.26, 札幌)

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

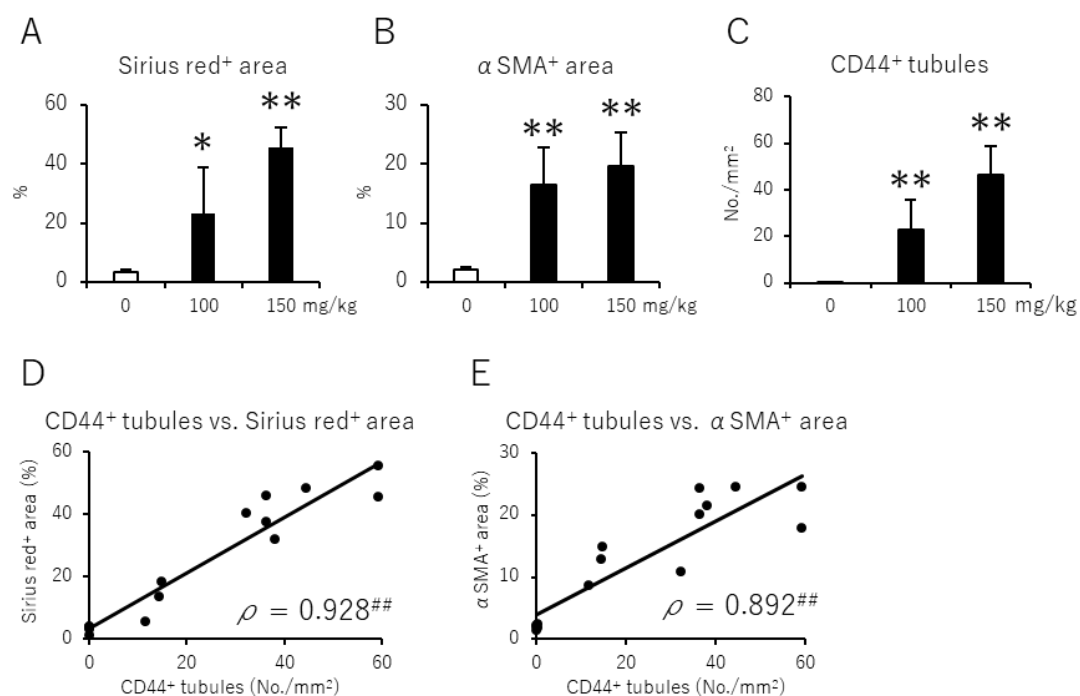


図1. **A:** シリウスレッド染色陽性面積. **B:**  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) 陽性面積. **C:** CD44陽性尿細管数. **D:** CD44陽性尿細管数及びシリウスレッド染色陽性面積の相関. **E:** CD44陽性尿細管数及び $\alpha$ SMA陽性面積の相関. \*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. 0 mg/kg. ##:  $p < 0.01$ .

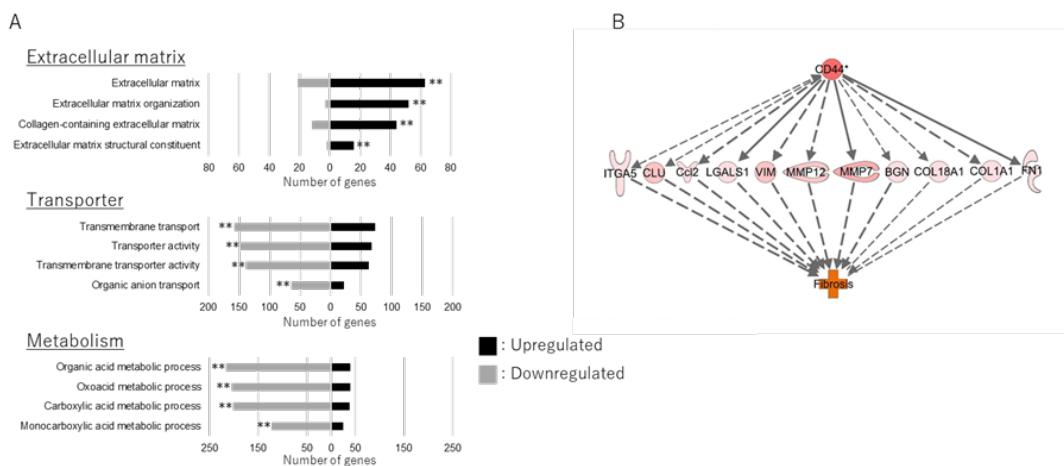


図2. マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析. **A:** Gene Ontology解析. **B:** Ingenuity Pathway Analysis. \*\*: corrected  $p < 0.01$  vs. normal tubule.

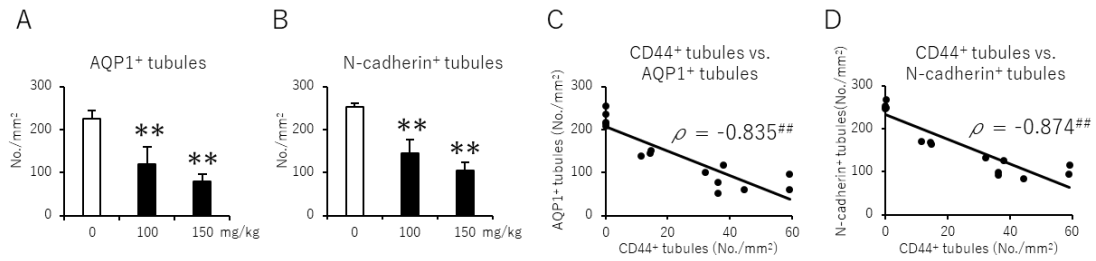


図3. **A:** Aquaporin-1 (AQP1) 陽性尿細管数. **B:** N-cadherin陽性尿細管数. **C:** CD44及びAQP1陽性尿細管数の相関. **D:** CD44及びN-cadherin陽性尿細管数の相関. \*\*:  $p < 0.01$  vs. 0 mg/kg. ##:  $p < 0.01$ .

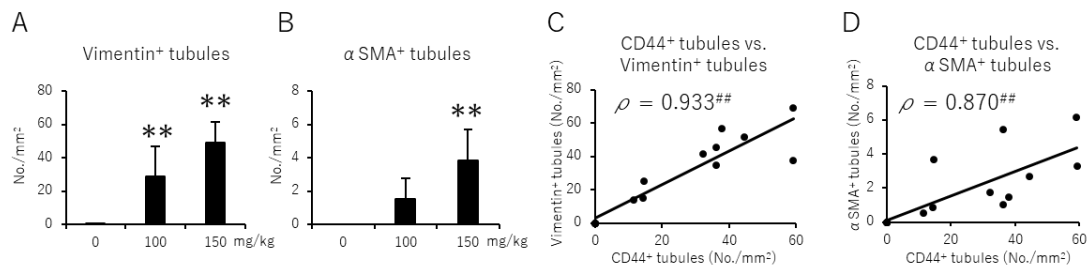


図4. **A:** Vimentin陽性尿細管数. **B:**  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) 陽性尿細管数. **C:** CD44及びvimentin陽性尿細管数. **D:** CD44及び $\alpha$ SMA陽性尿細管数. \*\*:  $p < 0.01$  vs. 0 mg/kg. ##:  $p < 0.01$ .

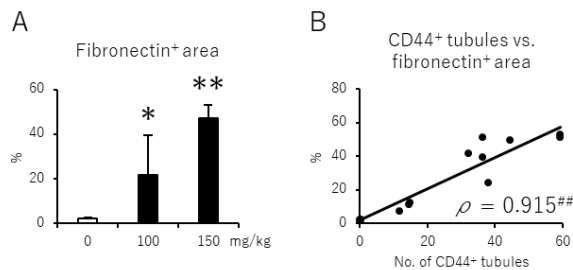


図5. **A:** Fibronectin陽性面積. **B:** CD44陽性尿細管数及びfibronectin陽性面積の相関. \*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. 0 mg/kg. ##:  $p < 0.01$ .



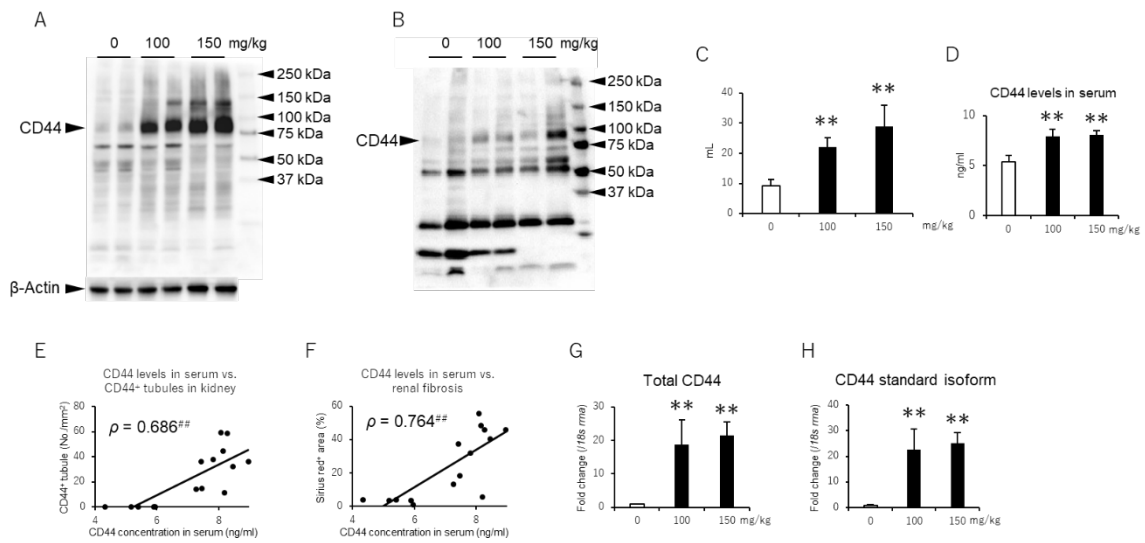


図6. 腎臓組織中 (A) 及び尿中 (B) CD44発現. C: 尿量. D: 血清中CD44値. E: 血清中CD44値及び腎臓におけるCD44陽性尿細管数の相関. F: 血清中CD44値及び腎線維化面積の相関. Total CD44 (G) 及びCD44 standard isoform (H) の遺伝子発現解析. \*\*:  $p < 0.01$  vs. 0 mg/kg. ##:  $p < 0.01$ .