

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5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 室長

研究要旨

腎障害後に尿細管の再生に異常が生じた場合、不可逆的な線維化を伴う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 が発現することを見出しており、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。本年度はシクロスポリン（CyA）誘発ラット腎線維化モデルを用いて 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 ラットに既報に従い実験期間を通して低 Na 食（0.05% Na）を給餌した。実験開始 1 週間後から媒体であるオリーブオイルもしくは CyA を 15 及び 30 mg/kg の用量で 28 日間反復皮下投与した。CyA 投与群では腎線維化が認められ、線維化病変には CD44 に陽性を示す拡張、萎縮あるいは肥大した尿細管が観察された。拡張/萎縮/肥大尿細管では近位尿細管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/肥大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。その結果、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/肥大尿細管の細胞質に確認されたが、免疫染色において fibronectin タンパクはこれらの尿細管の周囲間質に認められた。また CyA 投与群では血清中の 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

腎臓は化学物質による障害を受けやすい臓器であり、特に尿細管上皮細胞はその生理学的な特徴から腎毒性の主要な標的となる。尿細管上皮細胞は再生能力を有す

るが、障害後にその再生に異常が生じた場合、不可逆的な線維化が生じて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腎障害・腎線維化の 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、アロプリノール誘発ラット腎線維化モデルを用いて種々の検証を行った。本年度はシクロスポリン（CyA）誘発ラット腎線維化モデルを用いて 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

6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群（n=5）に配し、既報に従い実験期間を通して低 Na 食（0.05% Na）を給餌した。実験開始 1 週間後から媒体であるオリーブオイルもしくは CyA を 15 及び 30 mg/kg の用量で 28 日間反復皮下投与した。最終投与日の翌日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、血清生化学的検査により血液尿素窒素（BUN）および血清クレアチニン（sCre）を測定し、さらに ELISA 法により血清 CD44 値を測定した。

剖検時に腎臓の重量を測定し、組織の一部を 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℃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、aquaporin1（AQP1）、vimentin、collagen type IV および 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（LMD）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。

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）を実施した後に 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

CyA 15 および 30 mg/kg 投与群において対照群と比して有意な BUN および sCre の増加ならびに腎臓の絶対あるいは相対重量の有意な増加が認められた (表 1)。CyA 投与群ではシリウスレッド染色に陽性を示す線維化領域が増加していた (図 1A)。線維化病変内の尿細管は萎縮、拡張あるいは肥大していた。これらの尿細管は CD44 に陽性を示し、CD44 陽性尿細管の数は線維化面積と正の相関を示した (図 1B および C)。

マイクロアレイにおける GO 解析では、萎縮/拡張/肥大尿細管において正常尿細管と比して細胞外基質に関連する遺伝子群の発現が増加しており、トランスポーターおよび代謝といった尿細管の生理機能に関連する遺伝子群の発現が減少していた (図 2A)。またパスウェイ解析では 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 (図 2B)。免疫組織学的解析において、線維化病変内の萎縮/拡張/肥大尿細管では近位尿細管分化マーカーの AQP1 の発現が減少しており、AQP1 陽性尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と負の相関を示した (図 3A および B)。またこれらの尿細管では間葉系マーカーである vimentin が発現しており、vimentin 陽性尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した (図 3C および D)。蛍光二重免疫染色において CD44 は AQP1 と相互に排他的な発現を示し、vimentin とは共発現していた。細胞外基質の主要な構成要

素の一つであるフィブロネクチンの陽性面積は CyA 投与群において有意に増加しており、CD44 陽性尿細管と正の相関を示した (図 4A および B)。基底膜マーカーである collagen type IV の免疫染色では、線維化病変内の尿細管周囲に軽度に肥厚した基底膜が観察された。CD44 の下流因子候補でありフィブロネクチンをコードする *Fnl* の mRNA は正常尿細管と比して線維化病変内の尿細管の細胞質において増加していたが、フィブロネクチンタンパクはそれらの尿細管の周囲間質に沈着していた。

ELISA 法による血清 CD44 値の測定では、CyA 15 および 30 mg/kg 投与群においてそれぞれ対照群と比して上昇傾向および有意な上昇を示した (図 5A)。また血清 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管の数および線維化面積と正の相関を示した (図 5B および C)。

リアルタイム PCR により CyA 投与群では CD44 standard isoform が高発現していることが示された (図 6)。

D. 考察

これまでの我々の先行研究と同様に線維化病変内の尿細管では CD44 が発現しており、CD44 は再生異常の生じた尿細管において特異的に発現するという仮説を支持する結果となった。先行研究では線維化病変内の CD44 陽性尿細管は形態的に萎縮あるいは拡張していたが、CyA 誘発ラット腎線維化モデルではそれらに加えて肥大した尿細管も観察された。一般的に肥大は機能亢進を示唆する所見であるが、本研究における各解析の結果から今回みられた肥大尿細管では萎縮/拡張尿細管と同様に再生異常が生じていると考えられた。

マイクロアレイにおける GO 解析では、

線維化病変内の尿細管において間葉系の形質を示唆する所見が得られ、免疫染色ではこれらの尿細管において分化マーカーの発現減少および間葉系マーカーの発現が認められた。一方、これらの尿細管は基底膜に覆われており、尿細管上皮細胞の間質への明らかな浸潤像は認められなかった。またこれらの尿細管ではフィブロネクチンの分泌を示唆する結果が得られた。腎線維化の病態において尿細管が基底膜に接着した状態で間葉系の形質を獲得する現象を部分的上皮間葉転換 (pEMT) という。本研究結果から、線維化病変内の萎縮/拡張/肥大尿細管では pEMT が生じているものと考えられた。またパスウェイ解析の結果から 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し、腎線維化に寄与しているものと考えられた。

CyA 投与群では血清 CD44 値の上昇が認められ、血清 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管の数および線維化面積と正の相関を示した。これらの結果は、CyA 投与群における血清 CD44 値の上昇は腎臓における CD44 発現を反映したものであること、さらに血清 CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性を示唆するものと考えられた。

CD44 には多くの splice variant があり、その機能の多様性に関連していることが知られている。本研究結果から、CyA 誘発ラット腎線維化モデルにおいて主に発現している isoform は CD44standard であることが考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

本研究により再生異常の生じた尿細管に発現する CD44 の腎線維化における病態生理学的役割の一端を明らかにすることができた。さらに CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性も示された。これらの結果は腎障害・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結果と考えられた。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. CD44 expression in renal tubular epithelial cells in the kidneys of rats with cyclosporine-induced chronic kidney disease. *J Toxicol Pathol.* 2024;37(2):55-67. doi: 10.1293/tox.2023-0111.
2. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol.* 2024; 44(3):455-469. doi: 10.1002/jat.4554.

G-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. シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態と CD44 発現, 第 40 回日本毒性病理学会学術集会 (2024.01.24)
2. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シクロスポリン誘発慢性腎障害における CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.06.20)
3. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シクロスポリン誘発慢

性腎障害モデルラットにおける CD44 の
役割, 第 66 回日本腎臓学会学術総会
(2023.06.11)

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

表 1. 血清生化学的検査及び腎臓重量測定

	対照群	CyA 15 mg/kg	CyA 30 mg/kg
血清生化学的検査			
BUN (mg/dL)	16.6 ± 1.00	50.1 ± 12.4**	57.7 ± 11.4**
sCre (mg/dL)	0.26 ± 0.02	0.52 ± 0.13**	0.63 ± 0.12**
腎臓重量測定			
絶対重量 (g)	2.71 ± 0.27	3.38 ± 0.30*	2.92 ± 0.36
相対重量 (g%)	0.59 ± 0.04	0.87 ± 0.09**	0.84 ± 0.08**

** : $p < 0.01$ vs. Control.

CyA: シクロスポリン. BUN: 血中尿素窒素. sCre: 血清クレアチニン.

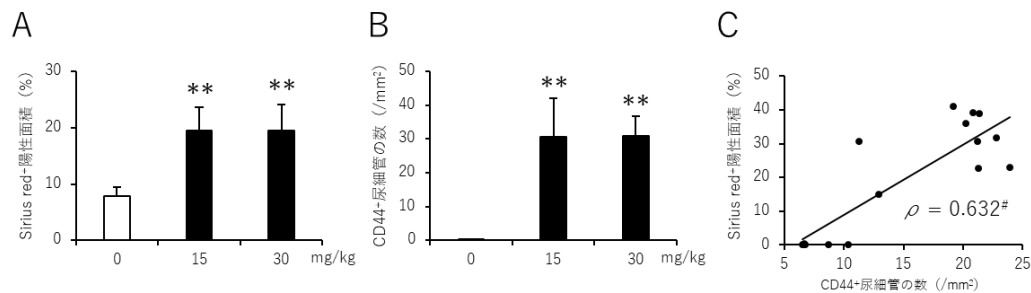


図 1. **A:** シリウスレッド陽性面積、**B:** CD44 陽性尿細管の数、**C:** シリウスレッド陽性面積および CD44 陽性尿細管の数の相関。Values are means \pm SDs. **: $p < 0.01$ vs. Control (Dunnett's test), #: $p < 0.05$ (Spearman's correlation test).

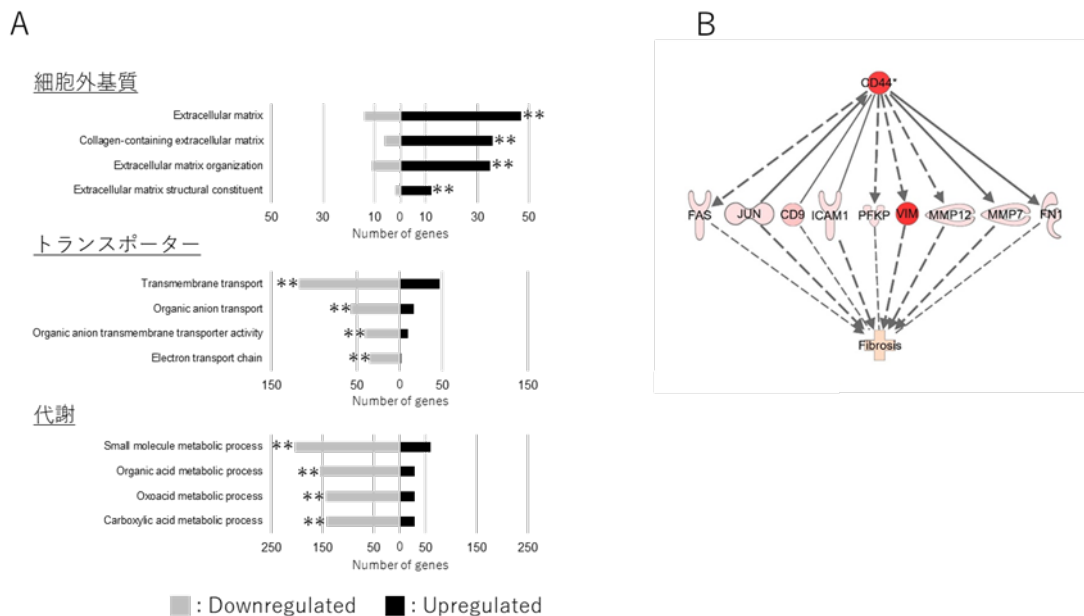


図 2. マイクロアレイにおける Gene ontology 解析 (A) およびパスウェイ解析 (B)。**: Corrected $p < 0.01$.

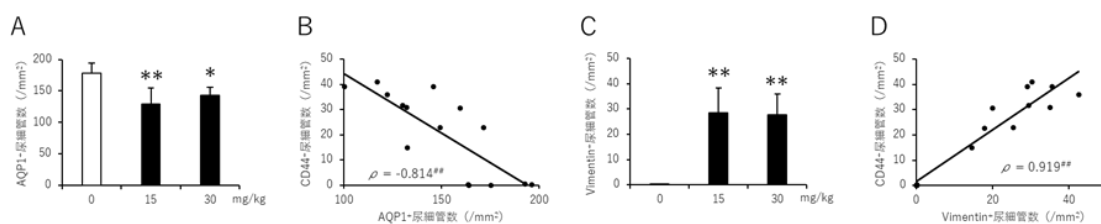


図 3. Aquaporin-1 (AQP1) 陽性尿細管の数 (A) および CD44 陽性尿細管の数との相関 (B).

Vimentin 陽性尿細管の数 (C) および CD44 陽性尿細管の数との相関 (D)。Values are means \pm SDs. *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. Control (Dunnett's test), #: $p < 0.01$ (Spearman's correlation test).

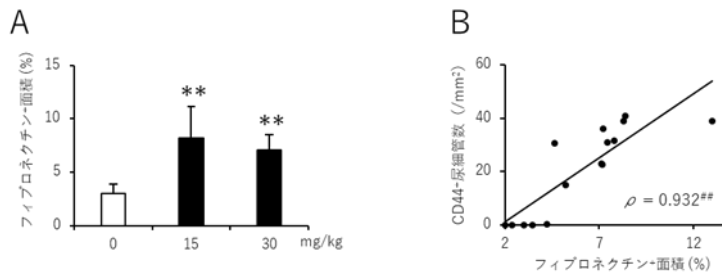


図 4. フィブロネクチン陽性面積 (A) および CD44 陽性尿細管の数との相関 (B)。Values are means \pm SDs. **: $p < 0.01$ vs. Control (Dunnett's test), #: $p < 0.01$ (Spearman's correlation test).

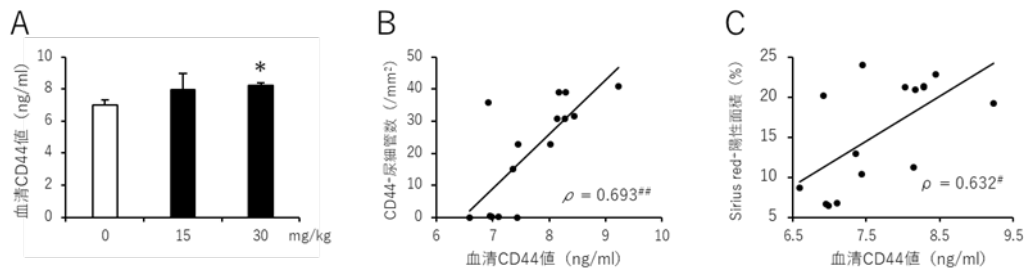


図 5. 血清中 CD44 値 (A) および血清中 CD44 値と腎臓における CD44 陽性尿細管の数 (B) ならびに線維化面積 (C) との相関。*: $p < 0.05$ vs. Control (Dunnett's test), #: $p < 0.01$ (Spearman's correlation test).

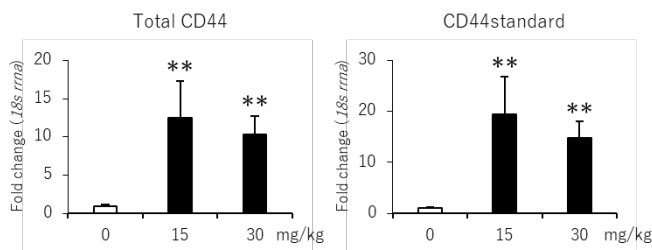


図6. Total CD44 およびCD44standardの遺伝子発現解析。**: $p < 0.01$ vs. Control (Dunnett's test)