

令和元年5月28日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08548

研究課題名(和文) ヒト培養細胞株を用いた簡便な腎毒性の検出；IL-6/IL-8レポーターの応用

研究課題名(英文) Rapid and easy detection of nephrotoxicity using human cultured cell lines; application of IL-6/IL-8 reporter gene

研究代表者

古倉 健嗣 (KOKURA, Kenji)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：30344039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：簡便な培養細胞による腎毒性試験法の開発は、毒性試験に用いる実験動物の数の削減や医薬品などの開発の総コストの削減に寄与する。最近、腎臓由来初代培養細胞では腎毒性物質に反応してIL-6/8 mRNAの発現量が上昇することが報告された。本研究では、ヒトにおける腎毒性を簡便にかつ定量的に検出するため、IL-6/IL-8遺伝子レポーターを導入したヒト腎臓培養細胞株を用いたスクリーニング系を確立する。このため遺伝子レポーターの作製、ヒト腎臓由来培養細胞の選定及びアッセイ条件の確認、レポーター遺伝子が実際に様々な腎毒性物質に反応するかを検討し、少数の腎毒性物質に対して期待通りの反応を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓は血液から老廃物を濾過後、水分や栄養分を再吸収する機能をもつため、毒性物質の暴露を受けて傷害されやすい。医薬品などの開発における腎毒性試験には、主にラットなどの実験動物が用いられてきた。しかし、実験動物で多くの化合物の腎毒性を明らかにすることは費用や時間がかかるうえ、腎毒性試験を通過した医薬品候補化合物の多くが臨床試験での腎傷害により開発断念されているなどの問題がある。そのため医薬品の開発初期段階でも利用しうる、簡便な培養細胞による腎毒性試験法の併用が期待されている。本研究は、この期待に資するものであり、将来的な簡便な腎毒性試験法開発に貢献したと思われる。

研究成果の概要(英文)：The development of a rapid and easy detection of nephrotoxicity using human cultured cell contributes to the reduction of the number of experimental animals used for the toxicity test and the reduction of the total cost of development of pharmaceuticals. Recently, it has been reported that in kidney-derived primary cultured cells, the expression level of IL-6 / 8 mRNA is increased in response to nephrotoxic substances. In this study, we attempted to establish a screening system using cultured human kidney cell lines into which IL-6 / IL-8 gene reporter has been introduced to detect nephrotoxicity simply and quantitatively. For this purpose, we constructed the IL-6 + IL-8 gene reporter genes, chose appropriate cultured human kidney-derived cells and confirmation of assay conditions, and examined whether the reporter gene responded to nephrotoxic substances. We finally confirmed the expected response using this reporter system with small number of test compounds.

研究分野：転写制御

キーワード：腎毒性試験 レポーター遺伝子 転写制御 ヒト腎臓培養細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓は血液から老廃物を濾過し、さらに生体に必要な水分や栄養分を再吸収する機能をもつため、毒性物質の暴露を受けて傷害されやすい臓器である。医薬品などの開発において腎毒性試験は欠かすことができない。しかしこれまで腎毒性を検出するためには、ラットなどの実験動物に目的の化合物等を投与し、尿・血液中でのマーカーの変動を測定することや、組織切片を病的に解析することが定石となっている。一方で、実験動物で多くの化合物の腎毒性を明らかにすることは費用や時間がかかるうえ、動物愛護や種差の観点からも問題がある。また、前臨床試験を通過した医薬品候補の多くが臨床試験での腎傷害により、開発断念を余儀なくされている。よって、動物実験による腎毒性試験だけでは不十分な点がある。そこで動物やヒト個体を用いる必要がない培養細胞による腎毒性試験法の併用が提案されている。以上のように、医薬品の開発初期段階でも利用しうる、簡便な腎毒性試験法の開発は社会的に有益である。

現状では、腎臓由来の細胞株は用いる細胞株ごとの性質の違いが大きく、動物やヒト個体で直接腎傷害を引き起こす化合物でも、細胞株によっては顕著な毒性を示さないこともあり、実用化には至っていない。これまで我々は、Kim1 遺伝子レポーターをもつマウス個体 (ルシフェラーゼ発光マウス) を用い、シスプラチンによる腎傷害を検出することに成功している。また同じレポーターをマウス腎由来の S3 細胞株に導入し、シスプラチンの毒性を *in vitro* で検出できることも確認している。しかしながら S3 細胞株では、ゲンタマイシンなどの腎毒性を検出できなかった。この原因としては S3 細胞株の性質や、Kim1 遺伝子の発現が *in vitro* での毒性には反応しにくいなどが考えられた為、他の培養細胞の利用や新たなレポーター遺伝子の応用が必要であると思われる。そこで本研究では、ヒト培養細胞とレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) を用いることでこれらの問題を解決することを試みた。

2. 研究の目的

これまでに我々は、腎毒性を検出するための培養系として腎傷害に伴って活性化される Kim1 遺伝子のレポーターをマウス腎由来細胞株に導入し、典型的な腎毒性物質であるシスプラチンに対して有効な成果を得ている。本研究はこれまでの成果を進展させ、創薬等に活用できるように、広範囲な化合物のヒトの腎毒性を迅速・簡便かつ定量的に検出するスクリーニング系をヒト培養細胞と IL-6/IL-8 遺伝子レポーターを用いて確立する。

現状では、ある程度腎臓細胞としての形質を保持するヒト細胞株の選定や、生理的な腎傷害様反応に基づく腎毒性物質の検出系の構築などが培養細胞を腎毒性試験に用いる際の課題点として挙げられる。これに関して、近年腎臓の形質をある程度保持したヒト培養細胞株が新たに樹立されてきており、腎毒性試験だけでなく、様々な研究に利用され始めている。また、腎臓由来初代培養細胞では腎毒性物質に反応して IL-6/8 mRNA の発現量が上昇することが報告された。本研究では、ヒトにおける腎毒性を簡便にかつ定量的に検出するため、IL-6/IL-8 遺伝子レポーターの利用を考えた。IL-6/IL-8 遺伝子レポーターを使用するには、各遺伝子のコンストラクトの作製が必要であり、とりわけ、腎毒性物質群に反応するために必要なヒト IL-6 と IL-8 の転写調節領域の同定及び、本当に反応するかの確認が必要になる。

以上を踏まえ、近年新たに樹立されたヒトの培養細胞株を用いて、Kim1 よりも早期に、強く活性化される IL-6 と IL-8 遺伝子レポーターによる検出系を構築する。これらの成果は腎毒性のメカニズム解明にもつながると期待できる。

3 . 研究の方法

ヒト培養細胞株へのレポーターの導入とその動作を確認し、既知の腎毒性化合物によるレポーターの適正評価を行い、ヒト培養細胞株による確実性が高く迅速性を備えた腎毒性試験法の確立を行う。

[用いる細胞株について] 近年、腎臓由来のヒト培養細胞株が相次いで樹立され、in vitro毒性評価に応用され始めている。種差を考慮すると試験に用いる細胞株はヒト由来が望ましく、本研究ではマウスS3細胞株に替えて、論文等で報告のあるヒト培養細胞株を用いる。その中でヒトHK-2細胞は、腎臓の形質を保持する細胞として認知されつつあるが、ゲンタマイシンなどの腎毒性物質に対する反応性は低い(傷害を受けにくい)。そこで、近年樹立されたHK-2以外の複数のヒト細胞株も用いる。

[用いるレポーターについて] ヒトやラット個体ではKim1遺伝子が良い腎傷害マーカーであることは知られているが、初代培養細胞やHK-2細胞株等においてもIL-6やIL-8の遺伝子発現がより早期に、また強く活性化されるとの報告がごく最近なされた (Kandasamy K et al., Prediction of drug-induced nephrotoxicity and injury mechanisms with human induced pluripotent stem cell-derived cells and machine learning methods. Sci Rep. 2015, 5: 12337)。この論文では、IL-6、IL-8遺伝子レポーターの活性化率は使用する毒性物質によって異なる。そこで、IL-6とIL-8 各々の遺伝子発現をモニターするデュアルレポーターコンストラクトを用いて、すでに論文で用いられている30種類程度の化合物(非腎毒性物質も含む)でテストを行う。また、Kim1レポーターと比較し、新規作成するレポーターの有用性を各細胞株で示すことを目指す。

4 . 研究成果

用いる培養細胞を選定するために、HK-2細胞とATCCより購入した細胞株Rに腎毒性物質を投与してIL-6とIL-8遺伝子の活性化がみられるかをまず確認した。参考にした論文 (Kandasamy K et al., Sci Rep. 2015, 5: 12337) で腎毒性物質として使われていたピューロマイシン、テトラサイクリンをテスト化合物に用い、HK-2細胞と細胞株Rの培養液に加え、16時間後にRNAを抽出し、RT-PCRを行った。その結果、HK-2細胞ではピューロマイシン、テトラサイクリン処理でのIL-6、IL-8の発現量にほとんど変化がなかった。一方で、細胞株Rでは、ピューロマイシン処理でIL-6、IL-8ともに30倍程度、テトラサイクリンに対しては10倍程度のIL-6/IL-8 mRNAの発現量の上昇が確認できた。その後、細胞株Rでは、シスプラチンとゲンタマイシンの添加でIL-8の発現量が数倍程度発現量の上昇が確認できた。このようにして、使用する細胞株の選定を行った。

IL-6遺伝子のレポーター構築に関しては、研究分担者らの情報から、IL-6遺伝子のレポーターにはより長い転写調節領域が必要であると考えられ、新たなコンストラクトを作製した。用いる領域は、論文を参考にした (Samuel JM, Kelberman D, Smith AJP, Humphries SE & Woo P (2008) Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. Cytokine 42, 256–264)。報告されている領域を含むヒトゲノムBACライブラリーを鋳型に用いてPCRで増幅し(約4.5 Kb)、SLG(ホタルルシフェリンを基質とし、緑色発光するルシフェラーゼ)を含むベクターにクローニング後、サンガー法にて増幅配列に変異が含まれていないかを確認した(このコンストラクトをIL-6::SLGと表記する)。その後、

この IL-6 転写調節領域をより明るい発光をする ELuc (Emerald Luc, IL-6::ELuc)や、もっとも一般的なホタルルシフェラーゼ (FLuc2, IL-6::FLuc2)とも結合させ、試用した。

IL-8 遺伝子レポーターに関しては、発表されている論文を参考にした (Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci. 2011 Dec;124(2): 359-69)。報告されている領域を含むヒトゲノム BAC ライブラリーを用いて PCR 増幅し(約 5.7 Kb)、Nano Luc(セレンテラジンや furimazine を基質とし、青色に発光するルシフェラーゼ)を含むベクターのクローニング後、サンガー法にて増幅配列に変異が含まれていないかを確認した(IL-8::NanoLuc)。

本研究では、デュアルルシフェラーゼアッセイを行う為、念の為、ルシフェラーゼの組み合わせを検討した。以前の研究では、SLG(緑色発光ルシフェラーゼ)と SLR(赤色発光ルシフェラーゼ)の組み合わせを用いてきたが、色調を区別するフィルターを搭載した高価なルミノメーターを使う必要があった。そのため本研究ではより汎用的に用いられているデュアルルシフェラーゼを用いることにした。プロメガ社の Nano-Glo Dual Luciferase Reporter Assay kit を使う場合においては Nano Luc との最適な組み合わせはホタル Luc2 であった。この場合、特別なルミノメーターやインジェクターが無くても、計測が可能である。

次に細胞株 R に、作製したレポーター遺伝子を一過性にトランスフェクションし、その後いくつかのテスト化合物(腎毒性物質)を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。IL-6::FLuc2 とトランスフェクション効率を補正するため(内部標準)の単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターと Nano Luc を結合させたコンストラクト (TK::NanoLuc) を同時にトランスフェクションした。IL8::NanoLuc は内部標準レポーターにヒトホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーターにホタルルシフェラーゼ (PGK::Luc2) のコンストラクトと共にトランスフェクションした。その翌日培地を交換し、さらに次の日にテスト化合物を添加し、16~18時間程度培養した。その後、細胞を PBS で洗浄後、デュアルルシフェラーゼアッセイを行なった。IL-6 または IL-8 レポーターの値は、各々の内部標準レポーターの値で補正した。テスト化合物としては、ピューロマイシン、テトラサイクリン、シスプラチンを用いた。その結果、IL-8 レポーターを用いた場合、テトラサイクリンとシスプラチンに関して、コントロール(薬物処理なし)と比べて 3 倍程度の活性化が見られた。ピューロマイシンはリボソーム阻害剤であり、タンパク質合成がストップするためと思われるが、ルシフェラーゼの活性自体が大きく低下していた。そのため、IL-6 も IL-8 も RT-PCR における内在性 mRNA のような活性化が観察されなかったのだと思われる。

IL-6 レポーターに関しては、残念ながらどの薬物に対しても顕著な活性化は観察されなかった。この原因としては、用いた IL-6 プロモーター断片に腎毒性に応答する領域が含まれていない可能性もある。ただし、デュアルルシフェラーゼアッセイにおいて FLuc2 の活性自体が NanoLuc 活性より弱いため、検出の誤差が大きくなっている可能性もある。また、今回は時間の関係で、一過性にレポーター遺伝子のトランスフェクションを行い、薬物処理後にルシフェラーゼアッセイを行なっている。予備実験の段階で、この細胞のトランスフェクション効率は 5%程度であり、ルシフェラーゼ活性を測定している細胞の割合が低い可能性もある。さらに、トランスフェクション自体が細胞に傷害を与えて、IL-6/IL-8 レポーターが活性化されてしまっていた可能性もある。実際、IL-8 レポーターの活性化も 3 倍程度であり、内在性 mRNA の活性化と比べると、誘導率が低い。以上の問題を解決するために、今後は IL-6、IL-8 の各レポーターをゲノムに取り込ませた安定細胞株樹立し、トランスフェクションの影響を排除した状態でのレポーターの評価が必要となる。

本件研究では少なくとも IL-8 レポーターの有用性を確かめた。レポーターを安定的に保持する細胞株の樹立や、さらに多くの薬剤を用いた比較を進めていけば、非常に簡易的な in vitro 腎毒性を検討するモデルとなりうる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Li Y, Kokura K, Inoue T. Stabilization of P/CAF, as a ubiquitin ligase toward MDM2, suppresses mitotic cell death through p53-p21 activation in HCT116 cells with SIRT2 suppression. *Biochem Biophys Res Commun.* 508(1): 230-236, 2019. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.136. (査読あり)
2. Tomimatsu K, Kokura K, Nishida T, Yoshimura Y, Kazuki Y, Narita M, Oshimura M, Ohbayashi, T. Multiple expression cassette exchange via TP901-1, R4, and Bxb1 integrase systems on a mouse artificial chromosome. *FEBS Open Bio* 7: 306-317, 2017. doi: 10.1002/2211-5463.12169. (査読あり)
3. Kokura K, Kuromi Y, Endo T, Anzai N, Kazuki Y, Oshimura M, Ohbayashi, T. A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells. *J. Gene Med.* 18: 273-281, 2016. doi: 10.1002/jgm.2925. (査読あり)
4. Endo T, Noda N, Kuromi Y, Kokura K, Kazuki Y, Oshimura M, Ohbayashi T. Evaluation of an Hprt-Luciferase Reporter Gene on a Mammalian Artificial Chromosome in Response to Cytotoxicity. *Yonago Acta Med.* 59: 174-182, 2016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973025/> (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

1. 奈良井節、綿世諒平、井上敏昭、古倉健嗣、小谷勇:CRISPR/CAS を利用した新規骨分化ハイ スループットスクリーニング系の樹立、第 18 回日本再生医療学会総会、神戸、2019.
2. 奈良井節、綿世諒平、古倉健嗣、加藤基伸、押村光雄、井上敏昭、小谷勇:骨分化の新規ハイ スループットスクリーニング系の樹立、第 47 回日本口腔外科学会中国四国支部学術集会、岡山、2018.
3. 大林徹也、古倉健嗣、喜多村真治:腎幹前駆細胞による再構成ネフロン様構造体を用いた in vitro 腎毒性試験法、第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪、2018.
4. 奈良井節、綿世諒平、加藤基伸、井上敏昭、古倉健嗣、小谷 勇、押村光雄:骨分化の新規ハイ スループットスクリーニング系樹立の試み、第 59 回日本生化学会 中国・四国支部例会、米子、2018.
5. 古倉健嗣、井上敏昭、安西尚彦、大林徹也:マウス・ヒト細胞株を用いた簡便な in vitro 腎毒性応 答の検出、第 59 回日本生化学会 中国・四国支部例会、米子、2018(口頭発表)
6. 奈良井節、綿世諒平、加藤基伸、井上敏昭、古倉健嗣、小谷 勇、押村光雄:骨分化の新規ハイ スループットスクリーニング系樹立の試み、第 17 回再生医療学会、横浜、2018.

〔その他〕

ホームページ等

<https://ja-jp.facebook.com/genoiko>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大林 徹也

ローマ字氏名：OHBAYASHI Tetsuya

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：研究推進機構

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80348804

研究分担者氏名：井上 敏昭

ローマ字氏名：INOUE Toshiaki

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80305573

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。