【241】

氏　名（本籍）	鈴　木　弘　美（神奈川県）
学位の種類	博　　士（生物科学）
学位記番号	博　甲　第　6116　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	**A Study on Toxicological Profiling by Analyzing mRNA Expression in Rat Cells** （ラット培養細胞の mRNA 発現解析による毒性プロファイリング方法の研究）

主　　査	筑波大学教授	理学博士	沼　田　　治
副　　査	筑波大学教授	理学博士	林　　純　一
副　　査	筑波大学教授	理学博士	漆　原　秀　子
副　　査	筑波大学教授	博士（理学）	中　田　和　人

論文の内容の要旨

化学物質は、これまでに数千万種合成され、毎日数千種ずつ増えており、生活の利便性に役立てられている。化学物質を安全に利用するためには毒性に応じたリスク管理が重要である。ヒトに適用する目的で合成される医薬品は、動物を用いる毒性試験の結果に基づいて生体毒性が評価され、その情報はリスク管理に利用される。一方で、化学物質の多くは生体毒性が未知のままで流通しており、リスク管理が充分とは言い難い。この主な原因は、膨大な種類の化学物質の全てについて動物の毒性試験を行うことが作業的にも倫理的にも不可能なことと、動物の毒性試験に代わる生体毒性の評価手法が無かったことである。生体毒性を評価するためには小規模な細胞実験系が有効と考えられる。しかし、一般的な細胞毒性評価系では細胞障害性や呼吸能など少数の指標を測定しているに過ぎないため、総合的な生体毒性の評価には適さない。したがって、化学物質を適切に利用するためには、生体毒性の評価に有効な代替法の構築が不可欠である。

本研究では、毒性の主要な標的臓器である腎臓と肝臓に対する生体毒性を、細胞評価系で評価できるかどうかを検討した。毒性試験で汎用されているラットから、腎尿細管上皮細胞と肝細胞の初代細胞を作出し、細胞評価系として用いた。毒性評価のための培養系としては、通常の培養法よりも細胞の形質を維持でき、かつ傷害された細胞の混入を避ける事ができる単層コラーゲンゲル培養を選択した。生体における肝毒性と腎毒性が既知の化学物質で細胞を処置し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ（Rat Toxicology U34 Array、Affymetrix）を用いて、mRNA 発現変動を網羅的に解析した。細胞評価系でみられた発現変化を、同じ被験物質を投与したラットの腎臓または肝臓の発現変化に関する文献報告と比較し、細胞評価系の有用性を調べた。この細胞評価系の汎用性を検討するために、複数の化学物質について検討した。

既知の毒性物質が尿細管初代細胞に及ぼす影響を評価した結果、DNA や SH 基と付加体を形成し、生体で尿細管壊死を誘発する白金錯体 2 種（シスプラチン、カーボプラチン）は、尿細管初代細胞では主に細胞障害関連遺伝子を誘導した。酸化ストレスを誘導し生体で尿細管壊死を誘発するセファロリジンは、初代細胞では主に酸化ストレス・細胞障害に関連する遺伝子を誘導した。尿細管にホスホリピドーシス（リソソーム・小胞体等でのリン脂質・薬物の蓄積）を誘発し壊死を引き起こすゲンタマイシンは、初代細胞では主に小胞

体ストレス・酸化ストレス・細胞障害に関連した遺伝子を誘導した。腎血流の低下に起因した間接的な尿細管壊死を誘発するジクロフェナクとシクロスポリンAは、初代細胞では抗酸化遺伝子を誘導し、ジクロフェナクについては、さらに細胞障害関連遺伝子を誘導し、直接作用の関与が示唆された。白金錯体・セファロリジン・ゲンタマイシンなどの直接障害物質に比べると、みられた変化は限られていた。

一方、肝初代細胞に対する既知の毒性物質の影響を調べた結果、DNAや蛋白質と付加体を形成し、生体で肝細胞壊死を誘発するアセトアミノフェンは、肝初代細胞では主に細胞障害関連遺伝子の誘導とグルココルチコイド誘導性遺伝子の抑制を引き起こした。肝臓でパーオキシソーム増生、それに伴う酸化ストレスや肝細胞肥大を誘発するクロフィブラートは、肝初代細胞では主にβ酸化関連遺伝子などパーオキシソームに関連した遺伝子を誘導した。DNAや蛋白質に対する付加体を形成し、生体で肝臓の類洞内皮細胞障害を誘発するシクロホスファミドは、肝初代細胞では主に細胞障害関連遺伝子を誘導し、さらにグルココルチコイド誘導性遺伝子を抑制し、直接作用の関与が示唆された。胆汁鬱滞を介して肝細胞障害を誘発すると考えられているクロルプロマジンとリトコール酸は、肝初代細胞では、薬物代謝酵素やシャペロン遺伝子の増減を含む少数の変化を引き起こしただけで、細胞障害を示唆する変化はみられなかった。肝毒性は低く、高用量投与した場合に稀に肝障害がみられるシスプラチンは、肝初代細胞では少数のストレス誘導性遺伝子を誘導した。

本研究によって、初代の尿細管細胞・肝細胞を用いた細胞評価系では、生体と同質の毒性変化を検出できることが、複数の化学物質について確認された。特に尿細管細胞については、腎臓細胞を用いてこのような有用性を検証した研究として新規性がある。また、酸化的障害、DNA障害、特定のシグナル経路の亢進・抑制など、毒作用を理解するために有用な情報を得ることができた。さらに、これまでに報告の無い発現変化も捉えられた。例えば白金剤を処置した尿細管細胞におけるナトリウムポンプ遺伝子の発現低下や、アセトアミノフェンを処置した肝細胞におけるグルココルチコイド誘導遺伝子の発現低下などである。間接的な機序により毒性を誘発すると考えられている化学物質については、動物の実験では特定が困難な、肝細胞や尿細管細胞に対する直接作用も検出することができた。以上の結果から、本細胞評価系を用いた生体毒性の評価は有効であると結論した。

審査の結果の要旨

本論文では、膨大な種類の化学物質の生体毒性を評価するために、まず毒性の主要な標的臓器である腎臓と肝臓から、腎尿細管上皮細胞と肝細胞の初代細胞を作成した。次に、これらの初代細胞に、生体における毒性既知の化学物質を処置し、mRNA発現変動を網羅的に解析した。その結果、初代細胞評価系でみられた発現変化は、同じ被験物質を投与したラットの腎臓又は肝臓で見られた発現変化と同質であり、本細胞評価系が化学物質の生体毒性を評価するために極めて有効であること証明した。本論文の極めて論理的な手法と、有益な成果は学問的にも高く評価できる。

平成24年2月1日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。