

博 士 論 文

近位尿細管領域由来不死化細胞を用いた
シスプラチン腎障害発症機構の解明

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

田 口 央 基

指導教授 角大悟

令和七年提出

目次

略号	1
----------	---

序章 研究の背景

1. はじめに	4
2. CDDP について	5
2.1. 抗がん作用	6
2.2. 副作用	6
2.3. CDDP 腎障害に関連する現状の課題	7
3. CDDP の腎臓への取り込みと排泄	8
3.1. OCT2	8
3.2. Ctr1	9
3.3. MATE1	10
4. CDDP 腎障害における細胞毒性発現機構	11
4.1. DNA 障害	11
4.2. 酸化ストレス	12
5. フェロトーシス	13
6. マウス近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞	15
7. 本研究の目的と特色	17
8. 本研究における検討内容の概要	17

実験方法

1. 試薬	19
2. 動物	23
3. 実験動物への CDDP 投与	23

4. 細胞培養	24
4.1. マウス近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞 (S1, S2, S3 細胞)	24
4.2. CDDP 耐性 S3 細胞 (CisR 細胞)	24
5. タンパク質の定量 (BCA 法)	25
6. 細胞生存率の測定	25
7. RT-qPCR 法による mRNA 量の測定	25
7.1. 細胞サンプルからの total RNA 抽出法	25
7.2. 腎臓組織サンプルからの total RNA 抽出法	26
7.3. 逆転写 (RT) 反応	27
7.4. Real time PCR 法	27
8. タンパク質量の測定法 (ウエスタンブロット法)	28
8.1. ウエスタンブロット用サンプル調整	28
8.2. SDS-PAGE	28
8.3. ウエスタンブロット法	28
9. 腎臓組織および細胞内における金属量の測定 (ICP-MS)	29
9.1. 湿式灰化	29
9.2. ICP-MS	31
10. 細胞内 ROS 量、過酸化脂質量及び細胞内 Fe ²⁺ 量の測定	31
11. 細胞周期分析	32
12. BUN および sCr の測定	32
13. 細胞内グルタチオン (GSH) 量の測定	33
14. DNA マイクロアレイ	34
15. small interfering RNA (siRNA)	34
16. 統計処理	35

第1章 白金系抗がん剤による各領域由来不死化細胞間での感受性の比較

1.1. 目的	36
1.2. 結果	37
1.2.1. S1細胞、S2細胞、S3細胞における白金系抗がん剤に対する感受性の比較	37
1.2.2. 白金系抗がん剤曝露による腎障害マーカーの上昇	37
1.2.3. 白金系抗がん剤の細胞内蓄積量の比較	38
1.2.4. CDDPの輸送に関与する輸送体タンパク質発現量の比較	39
1.3. 考察	40
第1章図表	44

第2章 S3細胞におけるCDDP高感受性にフェロトーシスが関与する

2.1. 目的	50
2.2. 結果	50
2.2.1. S1細胞、S2細胞、S3細胞におけるROS関連物質に対する感受性の比較	50
2.2.2. CDDPまたはPQ曝露後の細胞内ROS量の経時的な測定	51
2.2.3. CDDPまたはPQ曝露後の過酸化脂質量の測定	51
2.2.4. 抗酸化剤Trolox処理の効果	52
2.2.5. CDDPまたはPQ曝露後のNOX4タンパク質発現量の比較	52
2.2.6. CDDPまたはPQ曝露後の抗酸化タンパク質発現量の比較	52
2.2.7. CDDP曝露後の細胞内GSH量の比較	53
2.2.8. CDDPまたはPQ曝露後の細胞内Fe ²⁺ 量の比較	53
2.2.9. CDDP曝露後のSLC39A8 (ZIP8) タンパク質発現量の比較	53
2.2.10. フェロトーシス阻害剤処理の効果	54
2.3. 考察	55
第2章図表	60

第3章 CDDP 短時間曝露による遅発性腎障害機構の解明

3.1. 目的	71
3.2. 結果	71
3.2.1. CDDP を投与したマウスにおける経時的な腎臓組織中 Pt 量の変化	71
3.2.2. CDDP を投与したマウスの腎障害マーカーの経時的な変化	72
3.2.3. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における経時的な細胞内 Pt 量の変化	72
3.2.4. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 短時間曝露後の感受性の比較 ...	72
3.2.5. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における L-OHP または CBDCA 短時間曝露後の 感受性の比較	73
3.2.6. CDDP 短時間曝露における S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の細胞周期	74
3.2.7. CDDP 短時間曝露における S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の DNA 結合 Pt 量の比較	74
3.3. 考察	75
第3章図表	79

第4章 CDDP 耐性細胞を用いた新規腎障害責任因子の探索

4.1. 目的	86
4.2. 結果	86
4.2.1. CDDP に対する感受性の比較	86
4.2.2. L-OHP または CBDCA に対する感受性の比較	87
4.2.3. ROS 関連物質に対する感受性の比較	87
4.2.4. 細胞内 GSH 量および GSH 合成酵素の mRNA 発現量の比較	87
4.2.5. CDDP 曝露による細胞内 Pt 量および DNA 結合 Pt 量の比較	88
4.2.6. DNA マイクロアレイによる CDDP 結合タンパク質のスクリーニング	88
4.2.7. S3 細胞における SeP siRNA 導入による CDDP 毒性の検討	89
4.3. 考察	90

第4章図表	93
引用文献.....	102
発表論文リスト	117
謝辞	119

略号

2-ME	2-Mercaptoethanol
BSA	bovine serum albumin
BSO	buthionine-sulfoximine
BUN	blood urea nitrogen
CBDCA	carboplatin
CD98	4F2hc, subunit of heteromeric amino acid transporter
CDDP	cisplatin
CHP	cumene hydroperoxide
Ctr1	copper transporter 1
CYP	cytochrome P450
Cys	cysteine
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DFO	deferoxamine
DMEM F12-HAM	dulbecco's modified eagle medium nutrient mixture F-12
DMSO	dimethyl sulfoxide
D-PBS	dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
Fer-1	ferrostatin 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCLC	glutamylcysteine ligase catalytic submit
GCLM	glutamylcysteine ligase modifier submit
GPX4	glutathione peroxidase 4
GS	glutamine synthetase
GSH	glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide

His	histidine
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Kim-1	kidney injury molecule 1
LC ₅₀	Median Lethal Concentration
L-OHP	oxaliplatin
MATE1	multidrug and toxin extrusion protein 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NER	nucleotide excision repair
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NOX4	NADPH oxidase 4
Nrf2	NF-E2-related factor 2
OCT1	organic cation transporter 1
OCT2	organic cation transporter 2
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PQ	paraquat
Prx1	peroxiredoxin 1
QOL	quality of life
ROS	reactive oxygen species
RSL3	ras-selective lethal small molecule 3
SBD-F	4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt
sCr	serum creatinine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SeP	selenoprotein P
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SNAT3	solution carrier family 38, member 3

STEAP3	six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3
t-BHP	tert-butyl hydroperoxide
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	tetramethylethylenediamine
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxin reductase
xCT	cystine/glutamic acid transporter
ZIP	Zrt-Irt-like protein

序章 研究の背景

1. はじめに

化学療法は、がん治療において手術療法、放射線療法、および免疫療法と共に「四大療法」の一つとして位置づけられる。化学療法は、がん細胞の増殖を抑制し、がんの進行を抑えることで患者の生存期間延長に寄与する重要な治療法である。しかし、手術療法や放射線療法が局所的なアプローチであるのに対し、化学療法は抗がん剤が経口または注射によって投与されるため、血中を通じて全身に循環することから、副作用の発現頻度が高い。化学療法に伴う副作用の発現は、抗がん剤の減薬や中断など患者の生活の質（QOL）を著しく低下させるため、臨床的に重大な問題である。

抗がん剤の中でも、広域な固形がんで使用されるシスプラチン（CDDP）は、副作用として重篤な腎障害を引き起こすことが知られている。しかし、これまで多くの研究が行われてきたが、腎障害の発症機構は、いまだ解明されておらず、特異的な副作用予防薬は存在しない。CDDP 腎障害における発現機構を解明するためには、実験動物や培養細胞を用いた非臨床研究が重要である。CDDP は、実験動物を用いた研究から、近位尿細管の中でも S3 領域で高感受性を示すことが示されている。本研究では、マウス近位尿細管領域由来不死化細胞である S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いて、細胞間における CDDP に対する反応性の違いを比較し、CDDP 腎障害の責任因子の同定を目指して研究を行った。

2. CDDP について

シスプラチン (cis-diamminedichloro-platinum(II) : CDDP) は、2 つの塩化物 (Cl) イオン配位子と 2 つのアンモニア (NH₃) 配位子がシス配置で中央の白金 (Pt) 原子に配位した正方形平面錯体である (Fig. 1 A)。1845 年にイタリアの化学者 Michele Peyrone によって錯体の研究材料として合成された¹。しかし、その抗がん活性が明らかとなったのは、最初に合成されてから 100 年以上経過した 1960 年代になってからであった。1965 年に米国の生物物理学者 Barnett Rosenberg は、大腸菌を

含む溶液に白金電極を用いて電流を流し、電場が大腸菌の分裂に及ぼす影響を調べたところ、大腸菌の細胞増殖が阻害されるこ

とを発見した²。この現象を白金電極による電場の影響ではなく、何らかの化合物によるものであると仮説を立て検証を進めたところ、白金電極の白金イオンと溶媒中の塩化アンモニウムが結合した CDDP によるものであることを発見した。1969 年、彼らは CDDP の哺乳類への投与を検討することで、CDDP が抗腫瘍効果を有することが明らかとなった³。当初、*in vivo* 実験において強い腎毒性を示したため臨床への応用は断念されかけたが、投与前後に大量の生理食塩水と利尿薬の投与によって腎毒性が軽減されることが報告され⁴、1978 年にアメリカ食品医薬品局 (FDA) から抗がん剤として認可された⁵。

CDDP は、重篤な腎障害を引き起こすため、腎障害の少ない白金系抗がん剤の開発が行われ、カルボプラチン (CBDCA) やオキサリプラチン (L-OHP) などが開発された (Fig. 1 B, C)。しかし、どの白金系抗がん剤においても腎

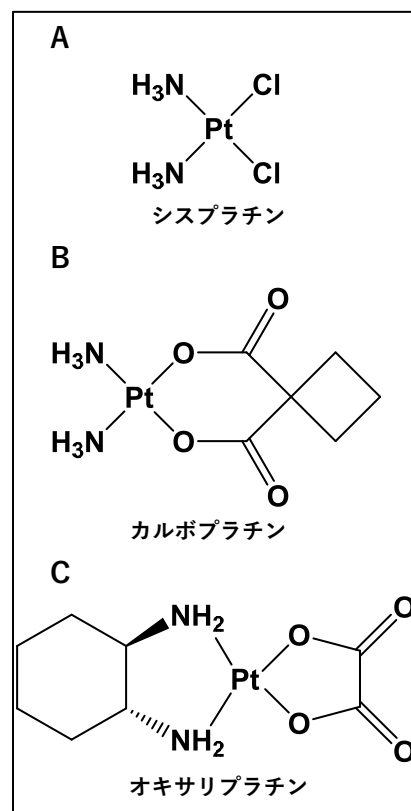


Fig. 1 白金系抗がん剤の構造式

白金系抗がん剤の構造式を示す。
(A) シスプラチン、(B) カルボプラチン、(C) オキサリプラチン

障害の発現は問題となっており^{6,7}、腎障害発現機構について多くの研究が行われてきたが、詳細な機構は解明されておらず、特異的な副作用予防薬も存在していない。

2.1 抗がん作用

CDDP は、臨床応用された最初の白金系抗がん剤であり、現在も精巣がん⁸、卵巣がん⁹、肺がん¹⁰など広域な固形がんの治療に使用されている。CDDP は、精巣がんに対して非常に有効であり、5 年相対生存率は 90%以上である¹¹。CDDP による抗がん作用の機序については完全には解明されていないが、CDDP が DNA と結合し、鎖間及び鎖内の架橋を形成することが広く知られている。CDDP は、DNA への架橋形成の結果、DNA の構造にゆがみを生じさせ、DNA 合成と複製を停止させる^{12,13}。がん細胞のような急速に分裂する細胞は、DNA 架橋を介した DNA 損傷の影響を強く受ける。軽度の DNA 損傷は、酵素などの働きによって修復することができるが、重度の DNA 損傷は不可逆的な障害と細胞死を誘導する。

2.2 副作用

CDDP は、広域な固形がんの治療に使用されている抗がん剤ではあるが、腎障害、神経毒性、耳毒性、悪心・嘔吐など多くの副作用を引き起こす。いくつかの副作用のうち、腎障害が CDDP 化学療法における減薬や中止などに繋がる用量制限毒性になっており、患者の予後に大きな影響を及ぼすことから、開発当初より問題とされている。CDDP は、主に腎臓から排泄されることから、CDDP による化学療法を受けている患者の約 30%に腎障害を生じさせる¹⁴。

これまでに、CDDP 腎障害を改善するためにさまざまな検討が行われてきた。1 つの方法として、正常組織に対して毒性が低い新規 CDDP 類似体を合成し、スクリーニングが行われた。この結果、CBDCA や L-OHP など CDDP

と比較して副作用の少ない医薬品が同定され、現在使用されている。しかし、CDDP 以外の白金系抗がん剤として現在世界的に承認されているのは、この2種類のみであり、腎障害の問題はあっても CDDP は、依然として臨床現場で広く使用されている¹⁵。また、CDDP 化学療法では、高用量の生理食塩水による水分補給や利尿薬の併用投与が行われている。これは、腎臓組織中の CDDP を尿中へ排泄亢進し、腎障害を軽減するために用いられている^{4,16,17}。このような背景から、CDDP 腎障害の詳細な発症機構を解明することは、抗腫瘍効果の高い CDDP の投与量の増量を介して、治療効果の増強につながる可能性がある。

2.3 CDDP 腎障害に関連する現状の課題

現時点における、CDDP 腎障害に関連する課題を以下に挙げる。

1. 既存予防法では、CDDP 腎障害を完全には抑制できない

CDDP 腎障害予防のため、大量の輸液を短時間で投与するショートハイドレーション法などの処置が行われているが、これは間接的な予防法であり、根本的な副作用の解決に至らない。

2. CDDP による腎障害発症機構は、不明な点が多い

CDDP 腎障害の詳細な発症機構は、不明な点が多く、治療標的の特定や治療法の設計が困難である。

3. 抗がん剤としての治療効果の維持と腎障害抑制の両立

CDDP の抗腫瘍効果を阻害しない、CDDP 腎障害の発症機構に基づく、副作用軽減法の探索が必要である。

3. CDDP の腎臓への取り込みと排泄

CDDP は、投与後全身循環に達し、血漿タンパク質と結合することにより不活性複合体を形成すると考えられている¹⁸⁻²⁰。遊離の CDDP は、ほぼすべて臓器に急速に分布することが知られている。腎臓は、CDDP の輸送に関わるトランスポーターの発現量が高いため、他の臓器と比較して腎臓における CDDP の組織中濃度が高くなる²¹。腎臓の最小

単位であるネフロンは、形態学および機能的にいくつかの分節から構成されている。ネフロンは、腎小体および尿細管から成り、尿細管の中でも近位尿細管は、輸送体を介して CDDP の血中からの尿細管分泌や原尿からの再吸収に関与するため、CDDP の近位尿細管における濃度は、血中の約 5 倍となり^{19,22}、特異的に障害を受ける²³。近位尿細管における CDDP の輸送に関与している輸送体として、Organic Cation Transporter 2 (OCT2)、High-Affinity Copper Transporter 1 (Ctr1)、Multidrug And Toxin Extrusion 1 (MATE1) などが報告されている (Fig. 2)。

3.1 OCT2

OCT ファミリーは、ラットやヒトなどから 5 種類 (OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, OCTN2) のアイソフォームが同定されている。OCT2 (SLC22A2) は、主に腎臓に発現し、ヒトの近位尿細管における有機カチオン (生理的 pH で正に帯電した分子) の尿細管分泌 (側底膜側) を媒介する²⁴。この作用により、OCT2 は糸球体ろ過量を増大させ、多くの陽イオン性薬物の血漿中からの除去において中心的な役割を果たす。医薬品の約 40%が陽イオン性薬物で

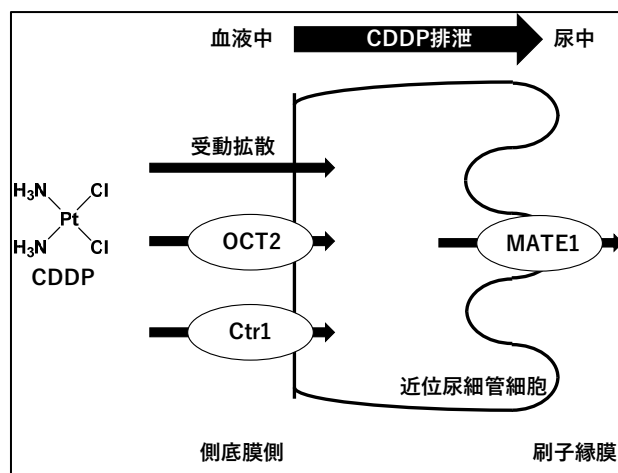


Fig. 2 腎臓における CDDP 輸送の模式図

腎臓近位尿細管における CDDP 輸送の模式図を示す。CDDP の取り込みには、OCT2 や Ctr1 などの輸送体が関与する。排泄には、MATE1 が関与することが報告されている。

あることから²⁵、尿細管分泌は多くの臨床的に重要な薬物の薬物動態に影響を与える²⁶。

OCT2 は、主に腎臓で発現しており、腎臓近位尿細管細胞の側底膜に局在している²⁷。また、大腸腫瘍細胞や腎腫瘍細胞など数種類のがん細胞でのみ発現していることから、抗腫瘍効果に影響を与えることなく CDDP の腎臓への取り込みを減少させる理想的な標的であることが示唆されている²⁸。OCT2 欠損は、CDDP の血漿濃度に影響を与えずに CDDP 腎障害を抑制し²⁹、骨肉腫のラットにおいて OCT2 阻害剤であるシメチジンの持続静脈内への投与は、CDDP の抗腫瘍活性に影響なく腎障害を抑制させた³⁰。また、がん患者において OCT2 の一塩基多型は、体内動態に変化をもたらさず、CDDP 腎障害を抑制した³¹。低マグネシウム血症は、近位尿細管における OCT2 の発現量を亢進させることで、CDDP の取り込みを増加させることが報告されている^{32,33}。現在、マグネシウムの補充は、CDDP 腎障害の予防に用いられている³⁴。

3.2 Ctr1

Ctr は、銅 (Cu^{2+}) の細胞への取り込みに関与することが認識されており、細胞膜に存在し、さまざまな原形質膜に分布している³⁵。 Cu^{2+} は、ミトコンドリアにおける ATP 産生や、細胞からの有害なフリーラジカルの除去など、生命活動の維持に必要である。しかし、過剰な Cu^{2+} は過酸化水素との反応によりヒドロキシラジカルを形成し、細胞毒性を引き起こす³⁶。そのため、細胞内における Cu^{2+} の恒常性の維持は、非常に重要である。Ctr は、鉄の恒常性に関与する遺伝子スクリーニング中に酵母で同定された³⁷。その後、Ctr ファミリー全体がさまざまな生物で発見され、現在では 6 種類の Ctr タンパク質が同定されている³⁸。

Ctr1 (SLC31A1) は、近位尿細管細胞および遠位尿細管細胞の側底膜側に局在している³⁹。3回膜貫通型であり、ホモ三量体を形成することにより機能する⁴⁰。Ctr1 による Cu^{2+} の輸送は、エネルギー非依存的であるが、温度、pH、

および K^+ の影響を受ける⁴¹。Ctr1 による Cu^{2+} の細胞内取り込みの正確なメカニズムは明らかになっていないが、この三量体はチャネルとして機能する中心孔を形成している⁴²。2002 年に酵母やマウス由来培養細胞を用いた研究から、Ctr1 の欠損によって CDDP の感受性および蓄積量を低下することが示された⁴³。これ以降、Ctr1 が CDDP を含めた白金系抗がん剤の細胞内取り込みに関与していることが報告された⁴⁴。そのため、Ctr1 は CDDP によるがん化学療法の感受性を規定する因子であると考えられている。一方、Ctr1 は多くの組織での分布が報告されており⁴⁵、腫瘍細胞においても CDDP の取り込みに関与することから⁴⁶、腎障害の抑制において、この輸送体を標的とする場合、薬剤の抗腫瘍効果に影響を与える疑念が生じる。

3.3 MATE1

MATE は、12 回膜貫通 α ヘリックスで構成されるタンパク質で、さまざまな生物種において恒常的に発現しており、多くの生命活動に関与している可能性が示唆されている。ヒトにおいては MATE1/2 が腎臓近位尿細管細胞の刷子縁膜に高発現しており、腎臓からの有機カチオンおよびアニオンの尿中への排泄を促進している⁴⁷。MATE1/2 は、メトホルミン、クロロキン、抗生物質、CDDP など、化学的に異なるさまざまな薬物を輸送することが示されている⁴⁸。

CDDP を投与した MATE1 ノックアウトマウスまたは MATE 阻害剤であるピリメタミンを前投与したマウスにおいて、CDDP の腎臓組織中の蓄積量が高く、生存率の低下を示し、腎障害の指標であるクレアチニンや BUN の値が上昇することが報告された。このことから、CDDP 腎障害において MATE1 が重要であることが示唆されている⁴⁹。しかし、ヒトにおける CDDP 腎障害での MATE ファミリーの寄与については、さらなる検討が必要である。

4. CDDP 腎障害における細胞毒性発現機構

CDDP 腎障害の細胞毒性発現機構については、これまで多くの研究が行われており、CDDP 腎障害の分子メカニズムが提唱されている。このメカニズムとして、細胞内ストレスである DNA 障害、ミトコンドリア障害、酸化ストレス、小胞体ストレスなどが関与しており、これらのストレス応答としてオートファジー、細胞周期停止、老化、アポトーシスなどが重要な役割を担っていることが報告されている⁵⁰。ここでは、本博士論文に関連する DNA 障害および酸化ストレスについて記載する。

4.1 DNA 障害

CDDP が細胞内に取り込まれると、クロライド配位子が水分子に置換される⁵¹。これは、細胞質の Cl^- 濃度 (4 mM) が、血液中の Cl^- 濃度 (100 mM) に比べて著しく低いためである⁵²。この置換反応によって生じた分子種は、非常に反応性が高く、核酸塩基中の求核性に富んだ部位の中でも、グアニン塩基の 7 位の窒素原子と優先的に配位結合を形成する⁵³。CDDP は、DNA の鎖内および鎖間の架橋を引き起こすことが知られており、これにより DNA 複製と転写が阻害されて DNA 障害を引き起こす^{12,13} (Fig. 3)。

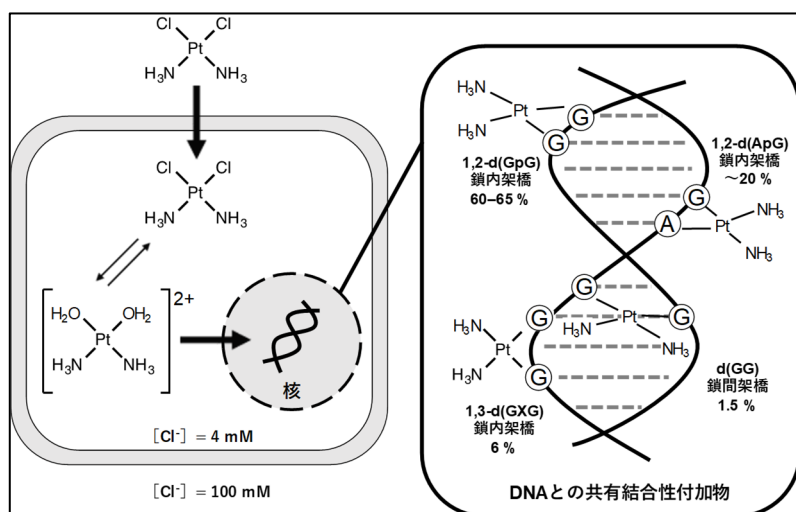


Fig. 3 細胞内における CDDP-DNA 付加体の形成⁵²

細胞内に取り込まれた CDDP は、クロライド配位子が水分子に置換されることで活性体となる。活性体となった CDDP は、核酸塩基中のグアニン塩基の 7 位の窒素原子と優先的に配位結合を形成する。

性に富んだ部位の中でも、グアニン塩基の 7 位の窒素原子と優先的に配位結合を形成する⁵³。CDDP は、DNA の鎖内および鎖間の架橋を引き起こすことが知られており、これにより DNA 複製と転写が阻害されて DNA 障害を引き起こす^{12,13} (Fig. 3)。

4.2 酸化ストレス

酸化ストレスは、生体において酸化力が抗酸化力を上回った状態であると定義されている⁵⁴。酸化ストレスを引き起こす要因として、生体内において発生する活性酸素種（ROS）に由来する酸化反応が関与している。ROSは、生体においてDNAの酸化、脂質の過酸化、タンパク質の変性、酵素の失活を引き起こす⁵⁵。一方、生体内にはROSを消去する抗酸化機能が備わっており、ROSによる酸化から生体を防御している⁵⁵。

抗酸化機能の一つとして Thioredoxin（Trx）システムが知られている（Fig. 4）。Trxシステムは、酸化還元活性を持つタンパク質または補酵素である Peroxiredoxin（Prx）、Trx、Thioredoxin reductase（TrxR）および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate（NADPH）から構成される^{56,57}。このシステムは、

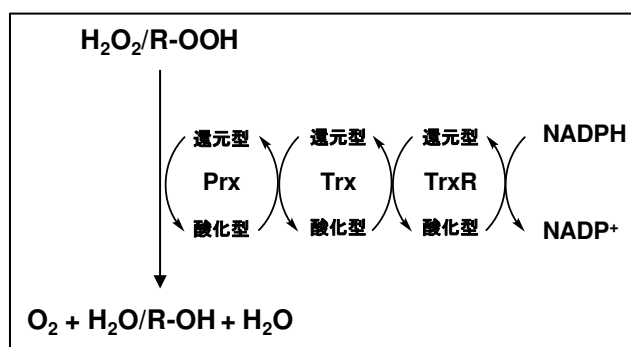


Fig. 4 Trx システム

TrxシステムはPrx, Trx, TrxR およびNADPHから構成される。これらは、酸化還元サイクルによって、細胞内で生じたROSを消去し、ROSによる酸化から生体を防御している。

転写因子の酸化還元制御、DNAの合成、細胞増殖、酸化ストレスからの保護など多くの細胞機能において重要な役割を果たしている⁵⁷。Trxは、一重項酸素を直接消去し、ヒドロキシラジカルを除去することや酸化されたROS標的タンパク質を間接的に還元することによって、抗酸化機能を発揮する⁵⁸。また、Trxは、Prxを介して、抗酸化機能を示す。PrxはSH基を利用して H_2O_2 やアルキルペルオキシドなどの過酸化物を直接還元する。さらに、酸化型となったPrxはTrxによって還元型を再生する⁵⁹。

CDDP腎障害における酸化ストレスの関与については、これまで多くの研究によって報告されてきた。ROSの発生については、主に3つの機序が提案されている。

1. CDDPは、グルタチオン（GSH）などのチオール含有抗酸化分子と急速に

反応する。その結果、GSH や抗酸化物質が枯渇し、細胞内の酸化ストレスが増加する⁶⁰。

2. CDDP は、ミトコンドリアの呼吸鎖を障害することで ROS 産生の増加を引き起こす。また、スーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼなどの抗酸化酵素が減少することにより、ミトコンドリア障害が増強する悪循環が形成される⁵⁰。

3. CDDP は、シトクローム P450 (CYP) 系を介して ROS の増加を引き起こす可能性がある。CYP2E1 ノックアウトマウスでは、CDDP による ROS 蓄積が減弱し、CDDP による腎障害が抑制される⁶⁰。

しかし、CDDP による ROS の発生機構について不明な点は多く、統一的な見解はない。

5. フェロトーシス

2012 年に Stockwell ら⁶¹は、鉄に依存した過酸化脂質の蓄積に特徴付けられるプログラム細胞死の一つとして、フェロトーシスを提唱した。Stockwell らは、化合物ライブラリーから抗がん剤のスクリーニングを行うことにより、Erastin や ras-selective lethal small molecule 3 (RSL3) を発見した。これらの化合物のメカニズム解析からフェロトーシスの存在が明らかにされてきた⁶¹ (Fig. 5)。

Erastin は、シスチントランスポーター (xCT) に結合し、細胞内への

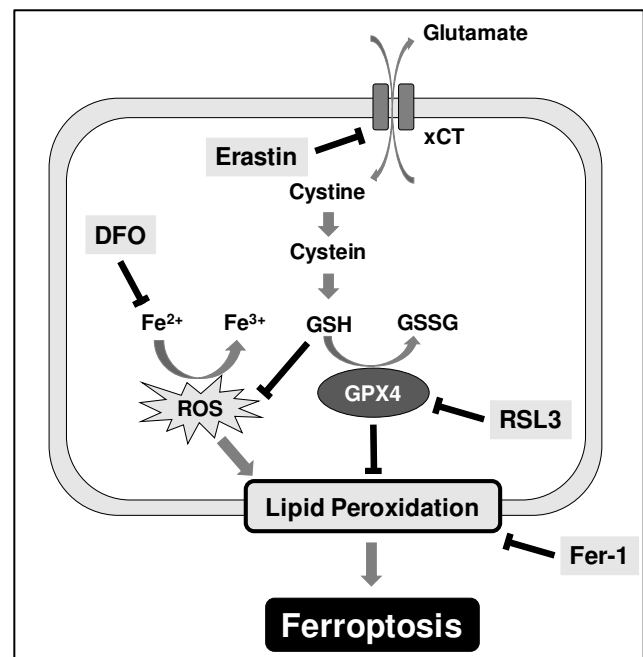


Fig. 5 フェロトーシスの模式図⁶³

フェロトーシスは、鉄に依存した過酸化脂質の蓄積を特徴としたプログラム細胞死である。細胞内の GPX4 は、GSH を利用して ROS により生成した過酸化脂質を還元することでフェロトーシスを抑制する。フェロトーシスの誘導剤としては、Erastin や RSL3 が使用されている。Erastin は、xCT を阻害することで GSH を減少させる。RSL3 は、直接的に GPX4 を不活化させることでフェロトーシスを誘導させる。フェロトーシスの阻害剤としては、抗酸化剤である Fer-1 や鉄キレーターである DFO が使用されている。

シスチンの取り込みを阻害する。その結果、細胞内のシステイン量が減少する。細胞内の還元物質である GSH は、グルタミン、システイン、グリシンからなるトリペプチドであるため、細胞内の GSH も減少し、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性が減少する。このとき、細胞内で Fe^{2+} を介したフェントン反応によりリン脂質の酸化が亢進し、細胞死が誘導される⁶¹⁻⁶³。この細胞死は、アポトーシスの特徴であるカスパーゼの阻害剤によって抑制されないこと、ネクロプトーシスに参与する因子のノックアウトによっても細胞死が誘導されることから、既知の細胞死とは異なる細胞死であることが示された。一方、RSL3 は、GPX4 の活性中心であるセレノシステインに共有結合して不活性化し、過酸化脂質を増加させてフェロトーシスを誘導すると考えられるが、GPX4 の上流である GSH 枯渇やシスチン取り込みには影響を与えない^{62,64}。

フェロトーシスの判別は、フェロトーシス阻害剤による細胞死の抑制と過酸化脂質を測定することによって行う。抗酸化剤である Trolox (ビタミン E 誘導体) や Ferrostatin-1 (Fer-1) などはフェロトーシス阻害剤であるが、鉄依存の細胞死であることを示すためには Deferoxamine (DFO) などの鉄キレート剤で細胞死が抑制されるかを確認する必要がある⁶⁴。

フェロトーシスは、生化学的・遺伝的・形態的にアポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーとは明らかに異なる⁶⁵。最近の研究から、フェロトーシスは多くの疾患の発生と発展において重要な調節的役割を果たしており、関連疾患の治療と予後改善に関する研究の焦点となっている⁶⁵。

6. マウス近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞

腎臓の近位尿細管は、構成する細胞のタイプ（細胞の大きさ、刷子縁の数・長さ、側底細胞膜の陥入の数・程度、細胞内小器官の数・形態、隣接細胞との tight junction など）により、S1, S2, S3 領域に分類される⁶⁶ (Fig. 6)。糸球体から続く近位曲尿細管が S1, S2 領域であり、ヘンレ係蹄の手前の近位直尿細管が S3 領域となっている。近位尿細管は、医薬品や環境汚染物質の標的となるが、尿細管の部位（S1, S2, S3）によって物質の蓄積性や感受性が異なる。例として、ゲンタマイシン⁶⁷や重クロム酸カリウム⁶⁸などの一部の腎障害誘発物質は、S1 領域と S2 領域に障害を与えることが報告されている。一方、実験動物に CDDP を投与すると、S3 領域が多く存在する部位を中心に腎障害を引き起こす^{20,23,69}。しかし、これらの腎障害誘発物質の領域特異的な毒性発現機構についての詳細な機序は明らかになっていない。この毒性発現機構を解明するためには、近位尿細管の各領域に由来する培養細胞株（マウス近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞）が有効な手段となる可能性がある。

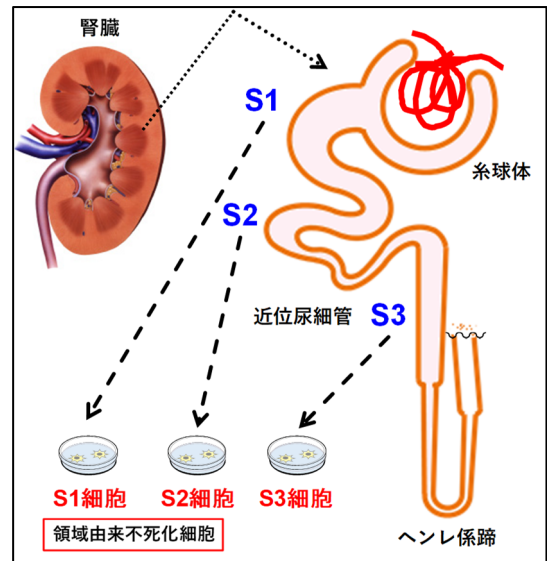


Fig. 6 近位尿細管 S1, S2, S3 領域

腎臓近位尿細管は、S1, S2, S3 領域に分類される。糸球体側から S1, S2, S3 領域に分類され、それぞれ輸送する物質が異なる。本研究では、領域ごとに単離し、不死化させた S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いることで、CDDP による S3 領域特異的毒性発現機構の解明に取り組んだ。

S1細胞、S2細胞、S3細胞は、マウス腎臓近位尿細管の各領域から初代培養細胞として樹立し、SV40 large T 抗原を用いて不死化したものである^{70,71}。これらの細胞において、各領域の特定のマーカートンパク質の発現量を測定し、領域の基本特性を維持しているかどうかを検討した (Fig. 7)。生体内において主に S1, S2

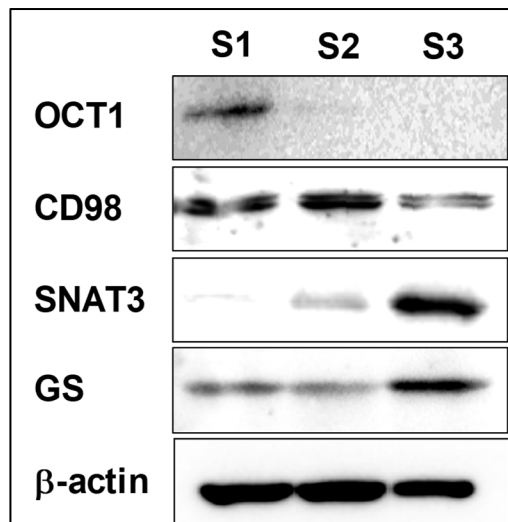


Fig. 7 領域別マーカートンパク質発現量

領域で主に発現していることが知られている OCT1 と 4F2hc, subunit of heteromeric amino acid transporter

S1細胞, S2細胞, S3細胞の全細胞溶解液を用いて、OCT1, CD98, SNAT3, GS のタンパク質発現量をウエスタンブロット法によって測定した。ローディングコントロールとしてβ-actinを使用した。

(CD98) の発現量は、S1細胞や S2細胞で高く、S3細胞では低く検出された。また、生体内で主に S3領域に発現している solute carrier family 38, member 3 (SNAT3)、glutamine synthetase (GS) の発現量は、S3細胞で最も多く検出された。このように、S1細胞、S2細胞、S3細胞は各領域固有のマーカートンパク質の発現量から、各々の領域の性質を保持していることを確認した。

7. 本研究の目的と特色

CDDP は、開発されてから 40 年以上使用されている稀有な抗がん剤であり、現在でも多くのがん患者に使用されている。CDDP を含めた白金系抗がん剤の世界市場規模は、2026 年までに約 2700 億円以上になることが予測されており、がん化学療法における白金系抗がん剤の汎用性は非常に大きい。一方、CDDP 化学療法における腎障害の発現は、CDDP 開発段階から問題視されており、これまで多くの研究が行われてきた。しかし、現在においても詳細な毒性発現機構は分かっておらず、CDDP 腎障害に対する特異的な予防薬は存在しない。また、CDDP 腎障害における重症例では血液透析が検討され、1 人当たり 500 万円/年ほどの医療費が必要となる。すなわち、CDDP 腎障害の解決は、患者の QOL の改善だけでなく、医療費削減という社会的にも大きく貢献できることが期待される。

本研究では、「CDDP の S3 領域における高感受性には何が関与しているのか？」を学術的な「問い」として位置付け、CDDP 腎障害における責任因子を明らかにすることを目的とした。具体的には、同一種由来で近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来の 3 種揃った唯一の細胞株であるマウス腎臓近位尿細管領域由来不死化細胞を活用することで、各領域における CDDP の反応性の違いについて詳細な検討に取り組んだ。

8. 本研究における検討内容の概要

第 1 章では、マウス腎臓近位尿細管領域由来不死化細胞である S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いた白金系抗がん剤に対する感受性の比較を行った。その結果、実験動物での報告と同様に、S3 領域由来である S3 細胞が白金系抗がん剤に対して高感受性を示すことが明らかとなり、その高感受性は白金系抗がん剤の細胞内 Pt 量の差では説明できないことを明らかにした。

第 2 章では、CDDP 腎障害の原因の一つとして考えられている ROS に着目し、検討を行った。S3 細胞は、ROS に対して脆弱であり、CDDP を曝露した

S3 細胞では、抗酸化タンパク質の減少や遊離 Fe²⁺量の増加など複数の要因から鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスが誘導されることを見出した。

第 3 章では、CDDP 腎障害におけるユニークな特徴である遅発性腎障害に着目し、機序の解明を目指した。CDDP 腎障害は、腎臓組織中への CDDP 蓄積に対して毒性発現が遅延するユニークな特徴を有している。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞への CDDP 曝露による細胞内 Pt 量のピークは 15 分であった。CDDP を 15 分間曝露し、CDDP が含まれない培地に交換したところ、経過時間依存的に細胞生存率は低下した。さらに、S3 細胞はいずれの培養日数においても高感受性を示した。また、S3 細胞は、CDDP を曝露した際の DNA 結合 Pt 量が高く、細胞周期の変動が S1 細胞や S2 細胞と比較して大きいことを明らかにした。

第 4 章では、CDDP 腎障害における新規責任因子を同定するため、CDDP 耐性 (CisR) 細胞を樹立した。CisR 細胞では、セレノシステイン含有タンパク質であるセレノプロテイン P (SeP) が高発現しており、SeP が CDDP 腎障害における新規防御因子である可能性を見出した。

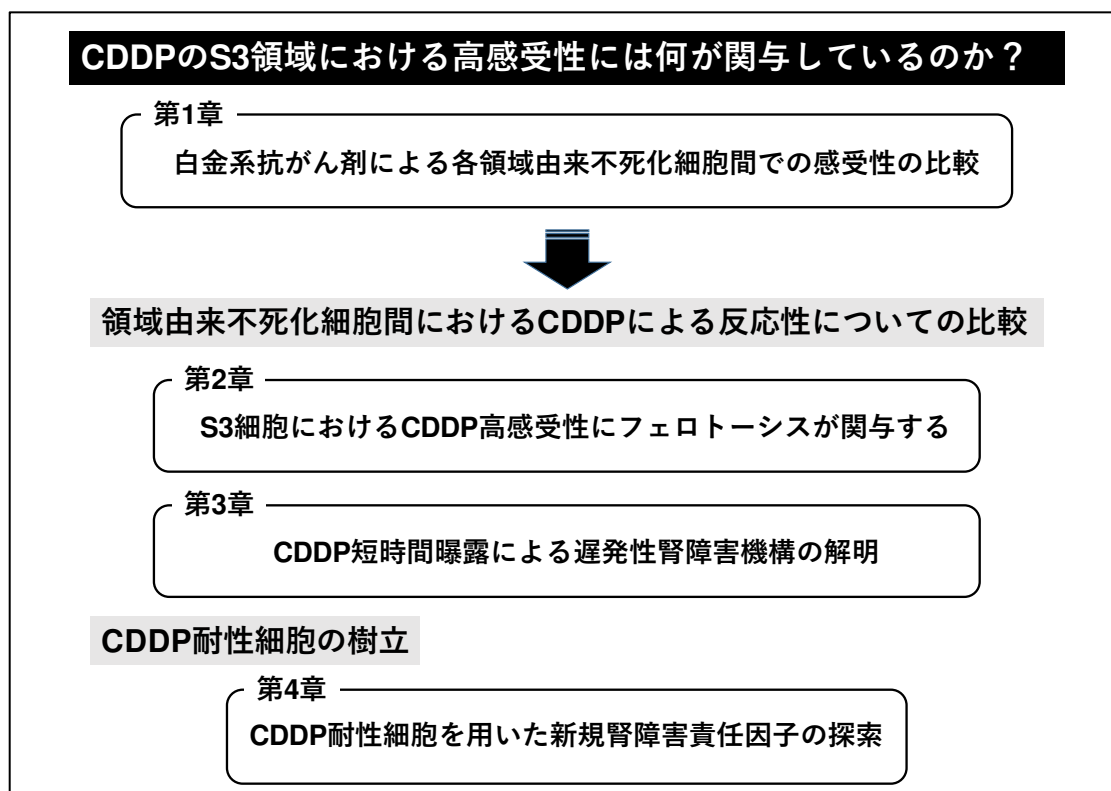


Fig.8 本博士論文における概念図

実験方法

1. 試薬

特に記載のない試薬に関しては特級試薬を用いた。水は、特に記載のない限り超純水製造装置 arium pro VF H2OPRO-VF-T (Sartorius Stedim Biotech 社, Göttingen, Germany)で調整した、 $18.2\Omega\text{-cm}$ の超純水を用いた。

【一般試薬】

- ・ 0.25% Trypsin (富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) : 201-16945)
- ・ 2 x SYBR Premix Ex TaqTM (タカラバイオ株式会社 (滋賀) : RR041A)
- ・ 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) : D399)
- ・ 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) (関東化学株式会社 (東京) : 40326-00)
- ・ 2-Mercaptoethanol (2-ME) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 131-14572)
- ・ 4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt (SBD-F) (同仁化学研究所株式会社 (熊本) : 84806-27-9)
- ・ 50 x ROX Reference Dye (タカラバイオ株式会社 : RR39LR)
- ・ Accutase (富士フィルム和光純薬株式会社 : 1000449)
- ・ Acrylamide (関東化学株式会社 : 01080-30)
- ・ Boric Acid (富士フィルム和光純薬株式会社 : 021-02195)
- ・ Bovine serum albumin (BSA) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 017-15146)
- ・ Bromophenol blue (関東化学株式会社 : 04319-30)
- ・ Buthionine-sulfoximine (BSO) (富士フィルム和光純薬株式会社 : B690270)
- ・ Carboplatin (CBDCA) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 033-25231)
- ・ Cell cycle reagent (Guava Technologies (Hayward, CA, USA) : 4500-0220)

- Chloroform (関東化学株式会社 : 2447-1B)
- Cisplatin (CDDP) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 039-20093)
- Cisplatin 点滴静注 (CDDP) (Pfizer (New York, NY, USA))
- Cumene hydroperoxide (CHP) (Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) : 80-15-9)
- Deferoxamine mesylate (DFO) (Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) : 138-14-7)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (キシダ化学株式会社 (大阪) : 120-25425)
- Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM F12-HAM) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 087-08335)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 166-23555)
- Epidermal growth factor (EGF) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 053-07751)
- Ethanol (EtOH) (関東化学株式会社 : 14033-00)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-2Na (同仁化学研究所株式会社 : 6381-92-6)
- FerroOrange (五稜化薬株式会社 (北海道) : GC904-01)
- Ferrostatin-1 (Fer-1) (Selleck Chemicals : 347174-05-4)
- Fetal bovine serum (FBS) (MP Biomedicals (Irvine, CA, USA) : 2917354H)
- GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) : G1N70)
- Glutathione (Reduced Form) (GSH) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 077-02016)
- Glycine (関東化学株式会社 : 01194-00)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 084-08961)
- Heparin sodium solution (持田製薬株式会社 (東京))
- Hydrochloric acid (HCl) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 080-01066)

- Hydrogen peroxide (H₂O₂) (ナカライテスク株式会社 (京都) : 20779-65)
- Insulin (フナコシ株式会社 (東京) : 0105)
- Isopropanol (関東化学株式会社 : 20322-09)
- LiperFluo (同仁化学研究所株式会社 : 1448846-35-2)
- Methanol (MeOH) (関東化学株式会社 : 25183-70)
- N,N'-Methylenebisacrylamide (富士フィルム和光純薬株式会社 : 138-06032)
- Nitric acid (HNO₃) (関東化学株式会社 : 28163-09)
- Nonidet P40 Substitute (富士フィルム和光純薬株式会社 : N649570)
- Oxaliplatin (L-OHP) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 152-02691)
- Paraquat (PQ) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 160-08871)
- Penicillin-Streptomycin solution (富士フィルム和光純薬株式会社 : 168-23191)
- Saline (大塚製薬株式会社 (東京))
- Skim milk (富士フィルム和光純薬株式会社 : 190-12865)
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 190-13981)
- Sodium chloride (NaCl) (関東化学株式会社 : 37144-00)
- Sodium deoxycholate (富士フィルム和光純薬株式会社 : 190-08313)
- Sodium hydroxide (富士フィルム和光純薬株式会社 : 192-15985)
- Sodium selenite hydrate (Na₂SeO₃·5H₂O) (Merck KGaA (Darmstadt, Germany) : 26970-82-1)
- Tetramethylethylenediamine (TEMED) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 205-06313)
- Transferrin (富士フィルム和光純薬株式会社 : 201-18084)
- Tri-n-butylphosphine (キシダ化学株式会社 : 020-79732)
- Trichloroacetic acid (TCA) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 203-04952)
- Triton X-100 (キシダ化学株式会社 : 020-81155)
- Trolox (富士フィルム和光純薬株式会社 : 202-17891)

- Trypan blue (富士フィルム和光純薬株式会社 : 204-21102)
- Tween 20 (富士フィルム和光純薬株式会社 : T1003)
- alamarBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen : DAL1100)
- tert-Butyl hydroperoxide (t-BHP) (富士フィルム和光純薬株式会社 : 023-13451)

【抗体】

- Anti-SLC31A1 / CTR1 antibody (Abcam (Cambridge, MA, USA) #ab129067)
- Anti-GAPDH antibody (富士フィルム和光純薬株式会社 #014-25524)
- Anti-GPx4 antibody (Proteintech (Chicago, IL, USA) #67763-1-IG)
- Anti-MATE-1 antibody (Santa Cruz Bio (Dallas, TX) #sc-138983)
- Anti-NOX4 antibody (Proteintech #14347-1-AP)
- Anti-OCT2 antibody (Proteintech# 10867-2-AP)
- Anti-Prx1 antibody (R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) #AF3488)
- Anti-TrxR1 antibody (R & D Systems #MAB7428)
- Anti-Trx antibody (Proteintech #14999-1AP)
- Anti-ZIP8 antibody (Proteintech #20459-1-AP)
- Anti- β -actin antibody (Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) #4967)

【PCR プライマー】

- Clusterin (タカラバイオ株式会社 : MA123684)
- GCLC (タカラバイオ株式会社 : MA111575)
- GCLM (タカラバイオ株式会社 : MA111764)
- GusB (タカラバイオ株式会社 : MA050366)
- Kim-1 (ユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京) : 1971989)

2. 動物

実験動物は、ICR系の雌マウス（6週齢）を用いた。日本エスエルシー株式会社（浜松）から購入し、飼育室内で一定期間飼育した後に使用した。飼育室内は、空調機器により室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗サイクルでプラスチックケージを用いて飼育した。マウスには、市販の飼料と水道水を自由に摂取させた。

本研究は、米国国立衛生研究所（NIH）が推奨する「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（実験動物の飼育と使用の手引き）」に定められた倫理ガイドラインに従って実施された。また、すべての動物実験は、徳島文理大学動物実験委員会（許可番号：21-1）が承認したプロトコルに従って実施された。このプロトコルは、実験動物の飼育および使用に関する指針に準拠した指令 2010/63/EU に従っており、ARRIVE ガイドラインにも準拠している。動物が受ける苦痛を最小限に抑えるよう最大限の努力を行った。マウスは、無作為にグループ分けを行った（ $n=4-5$ ）。

3. 実験動物への CDDP 投与

CDDP 酢酸塩を 15 mg/kg の用量で腹腔内単回投与し、CDDP 投与 5, 15, 30, 45 分後、1, 6, 12 時間後、1, 2, 4, 7 日後に解剖を行った（ $n=4-5$ ）。マウスは、麻酔下（ミダゾラム（ 4 mg/kg ）、メデトミジン（ 0.75 mg/kg ）、ブトルファンール（ 5 mg/kg ）を腹腔内投与）で下大静脈からの採血後に腎臓を摘出し、摘出した臓器は、直ちに液体窒素により凍結後、 -80°C で冷凍保存した。また、採取した血液サンプルは、 4°C 、 $1,000\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。採取した血漿サンプルは、その後の測定まで -80°C で保存した。

4. 細胞培養

4.1. マウス近位尿管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞 (S1, S2, S3 細胞)

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞は、千葉大学の安西尚彦教授から供与していただいたものを使用した。これらの細胞は、領域由来別の特異的なマーカータンパク質の発現量を確認することにより性質を保持していることを確認した (背景 6.)⁷²。細胞の培養には、CO₂ インキュベーター MCO-170AICUVD-PJ (PHC 株式会社, 東京) を使用し、37°C、5% CO₂/95% Air の条件下で培養した。培地には、DMEM F-12-HAM 培地を用い、5% FBS、1 µg/mL Insulin、10 ng/mL EGF、10 µg/mL Transferrin、100 U/mL penicillin、100 µg/mL Streptomycin を添加したものを使用した。実験には、継代数 1-15 の各種細胞を使用した。

4.2. CDDP 耐性 S3 細胞 (CisR 細胞)

S3 細胞を親株細胞として、CDDP を低濃度 (0.5 µM) で曝露し、生存した細胞を継代した。徐々に CDDP 濃度を上昇させ (1, 3, 5 µM) 継代を繰り返し、最終的には、5 µM の CDDP 存在下で増殖可能な細胞を得た (CisR 細胞)。細胞の培養には、CO₂ インキュベーター MCO-170AICUVD-PJ を使用し、37°C、5% CO₂/95% Air の条件下で培養した。培地には、DMEM F-12-HAM 培地を用い、5% FBS、1 µg/mL Insulin、10 ng/mL EGF、10 µg/mL Transferrin、100 U/mL penicillin、100 µg/mL Streptomycin を添加したものを使用した。実験には、継代数 1-15 の各種細胞を使用した。CisR 細胞は、5 µM の CDDP 存在下で維持し、実験に使用する際は、CDDP を含まない培地で 3~4 日間培養したものを使用した。

5. タンパク質の定量 (BCA 法)

タンパク質の定量は、BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) を使用して定量した。BCA 試薬 A と BCA 試薬 B を 50:1 で混合し、10 μ L のサンプルを加えた 96 well plate に 200 μ L の混合液を添加した。暗所室温で 30 分間反応させた後、540 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific 社) によって測定し、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質として作成した検量線から、各サンプルのタンパク質濃度を算出した。

6. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定には、alarBlue 法を使用した。alarBlue 溶液の成分であるレサズリンは、無毒性の細胞透過性化合物で青色の非蛍光物質であり、生細胞に浸透すると、ミトコンドリアに存在する NADPH によって赤色で蛍光を示す化合物であるレゾルフィンに還元される。96 well plate で培養した細胞に、1 well あたり 10 μ L の alarBlue 溶液と 100 μ L の培養培地を混合したものを添加し、CO₂ インキュベーター MCO-170AICUVD-PJ 内で 2 時間培養した。生細胞によるレサズリン (青色) からレゾルフィン (赤色) への変換は、マイクロプレートリーダー Multiskan FC により 540 nm の吸光度を測定した。

7. RT-qPCR 法による mRNA 量の測定

7.1. 細胞サンプルからの total RNA 抽出法

細胞サンプルからの total RNA の抽出には、Blood/Cultured Cell Total RNA Mini Kit (FAVORGEN 社, TAIWAN) を用いた。まず、1~5 \times 10⁶ cells の細胞を 1.5 mL エッペンチューブに回収し、300 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分間遠心し、上清を除去し細胞ペレットとした。350 μ L の FARB Buffer と 3.5 μ L の 2-ME をペレットに加え、完全に溶解するまでボルテックスとピペッティングを行った。細胞溶

解液を、付属の Filter column に添加し、18,000×g, 4°C, 2 分間遠心することにより、不純物を除去した。ろ過液と同量の 70% EtOH を加え、ボルテックスし、FARB Mini Column Set に添加した。18,000×g, 4°C, 1 分間遠心し、ろ過液を破棄した。次に、500 μL の Wash Buffer 1 を FARB Mini Column に加え、18,000×g, 4°C, 1 分間遠心し、ろ過液を破棄した。さらに、750 μL の Wash Buffer 2 を FARB Mini Column に加え、18,000×g, 4°C, 1 分間遠心し、ろ過液を破棄した（同様の操作を 2 回行った）。FARB Mini Column から Buffer を完全に除去するため、18,000×g, 4°C, 3 分間遠心した。FARB Mini Column を Elution Tube に取り付け、RNase free water を 40 μL 添加した。18,000×g, 4°C, 1 分間遠心し、RNA を溶出させた。抽出した total RNA 濃度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて 260 nm における吸光度を測定して算出した。

7.2. 腎臓組織サンプルからの total RNA 抽出法

腎臓組織サンプルからの total RNA の抽出には、ISOGEN (ニッポン・ジーン社, 東京) を用いた。摘出した腎臓組織サンプル 25 mg に 1 mL の ISOGEN を加え、4,000 rpm, 1 分間で Micro Smash MS-100 (トミー精工株式会社, 東京) を使用し、ホモジナイズした。そこに、200 μL の Chloroform を加え、15 秒ボルテックスして混和し、室温で 2~3 分間静置した。12,000×g, 4°C, 15 分間遠心し、2 層に分かれた上層を別のチューブに回収した。回収した上層に、500 μL の Isopropanol を加え、12,000×g, 4°C, 10 分間遠心した。上清を除去し、RNA のペレットを 70% EtOH を加えて洗浄した。12,000×g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を除去した後、得られたペレットを乾燥させ、RNase free water でペレットを溶解した。抽出した total RNA 濃度は、Nano Drop 2000 を用いて 260 nm における吸光度を測定することで算出した。

7.3. 逆転写 (RT) 反応

RT 反応には、PrimeScrip RT Master Mix (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用した。0.2 mL マイクロチューブに、2 μg の Total RNA と 4 μL の 5 \times PrimeScrip RT Master Mix を加え、全量が 20 μL になるように RNase free water を加えた。逆転写反応は、サーマルサイクラー TP100 (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて行った。37 $^{\circ}\text{C}$, 15 分間で逆転写反応を進行させ、85 $^{\circ}\text{C}$, 5 秒間で逆転写酵素を熱失活させた。

7.4. Real time PCR 法

RT 反応によって得られた cDNA を鋳型として、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて、以下に示す条件で反応混合液を作製し、qPCR 用プレートに混合した。本混合液を 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間加熱した後、95 $^{\circ}\text{C}$, 5 秒、60 $^{\circ}\text{C}$, 1 分のサーマルサイクルを 40 回行った。PCR およびデータ解析は、CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて行った。

反応混合液組成 <1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
2 \times TB Green Premix Ex Taq II	10 μL	1 \times
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
ROX reference Dye (50 \times)	0.4 μL	1 \times
RT product	2 μL	
RNase free water	6 μL	
Total	20 μL	

8. タンパク質量の測定法（ウエスタンブロット法）

8.1. ウエスタンブロット用サンプル調整

細胞は、培地を除去後、D-PBS で 3 回洗浄を行い、RIPA Buffer【50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40 Substitute, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS】により可溶化した。その後、Handy Sonic UR-20P（トミー精工株式会社、東京）による 5 秒間×3 回の超音波処理で破碎し、12,000×g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を回収した。試料は、BCA 法によりタンパク定量した後、泳動用サンプルとして使用するまで -80°C で保存した。

8.2. SDS-PAGE

8.1 で作製したサンプルに 2×Sample Buffer【130 μM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% bromophenol blue, 9% 2-ME】を 1:1 で加え、95°C, 5 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。SDS-ポリアクリルアミドゲルの分離ゲル濃度は 5-15%、濃縮ゲルは 4%とした。SDS-ポリアクリルアミドゲルに 10 μg のタンパク質が含まれるようにサンプルをアプライした。電気泳動は、装置名 AE-6500（ATTO 株式会社、東京）を使用した。電気泳動には、Running Buffer【25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS】を用い、濃縮ゲル泳動中は 10 mA で、分離ゲル泳動中は 20 mA の電流で泳動した。タンパク質分子量の指標としてワイドビュープレステインタンパク質サイズマーカーⅢ（富士フイルム和光純薬株式会社（大阪））を使用した。

8.3. ウエスタンブロット法

電気泳動したゲルを転写装置名ミニプロテイン Tetra セル（Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA）を用いて Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）に転写した。PVDF 膜への転写には、Transfer Buffer【25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% MeOH】を用い、103 V、1 時間転写した。その後、TTBS【10 mM Tris (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20】

で溶解した 5% Skim milk 溶液で 1 時間ブロッキングを行った。さらに、PVDF 膜を TTBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返し、条件に合わせて希釈した 1 次抗体に 4°C、一晩反応させた。反応後、PVDF 膜を TTBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返し、HRP 標識二次抗体 (Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)) を室温、1 時間反応させた。反応後、TTBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返し、ウエスタンブロッティング検出試薬 Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore 社, Billerica, MA, USA) を用いて検出を行った。検出したバンドの強度は ImageJ を用いて数値化した。

9. 腎臓組織および細胞内における金属量の測定 (ICP-MS)

腎臓組織内、細胞内の金属蓄積量は、前処理として湿式灰化を行った後、誘導結合プラズマ質量分析法 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ; ICP-MS) を用いて測定した。

9.1. 湿式灰化

摘出した腎臓組織サンプルは秤量し、約 25 mg を切り出して使用した。細胞サンプルは、6 cm dish に $1-7 \times 10^5$ cells/dish に播種したものを一晩培養し、各金属化合物を各濃度で曝露し、指定の曝露時間で培養したのち、D-PBS で 3 回洗浄した後、1 mL の D-PBS で回収した。細胞からの DNA 抽出には、GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich 社, St. Louis, MO, USA) を用いて行った。細胞は、6 cm dish に 1×10^6 cells 播種し、一晩培養した。1 mM の CDDP を細胞に添加し、15 分間曝露した後、PBS での洗浄を 3 回繰り返し、1.5 mL のエッペンチューブに細胞を回収した。300×g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を除去することにより細胞ペレットとした。200 μL の Resuspension Buffer と 20 μL の RNase A Solution で細胞ペレットを懸濁し、室温、2 分間静置した。次に、200 μL の Lysis Solution C と 20 μL の Proteinase K をサンプルに加え、ボルテックス (約 15 秒) で十分に攪拌し、70°C, 10 分間

反応させた。GenElute™ Miniprep Binding Column（結合カラム）に 500 μ L の Column Preparation Solution を加え、12,000 \times g, 1 分間遠心し、ろ過液は廃棄した。サンプル溶液へ 200 μ L の 95~100% EtOH を加え、5~10 秒間ボルテックスして混合した。結合カラムにサンプル溶液を全量加え、6500 \times g, 1 分間遠心した。500 μ L の Wash Solution を結合カラムに添加し、6500 \times g, 1 分間遠心し、ろ過液は廃棄した。さらに、500 μ L の Wash Solution を結合カラムに添加し、16,000 \times g, 3 分間遠心して結合カラムを乾燥させた。結合カラムを新しいコレクションチューブに付け替え、200 μ L の Elution Solution をカラムに加え、6500 \times g, 1 分間遠心することにより DNA を溶出させた。抽出した DNA 濃度は、Nano Drop 2000 を用いて 260 nm における吸光度を測定して算出した。本研究における金属化合物の濃度、曝露時間について下記の表に示す。

各金属化合物の動物・細胞への曝露濃度と曝露期間

	動物・細胞	化合物名	濃度	曝露時間
第 1 章 2.3	S1, S2, S3	CDDP	0.5 μ M	1, 3, 6 days
第 1 章 2.3	S1, S2, S3	L-OHP	0.5 μ M	1, 3, 6 days
第 1 章 2.3	S1, S2, S3	CBDCA	0.5 μ M	1, 3, 6 days
				5, 15, 30, 45 min
第 3 章 2.1	ICR マウス	CDDP	15 mg/kg	1, 6, 12 h
				1, 2, 4, 7 days
第 3 章 2.3	S1, S2, S3	CDDP	5 μ M	5, 15, 30 min
第 3 章 2.7	S1, S2, S3	CDDP	1 mM	15 min
第 4 章 2.1	S3, CisR	CDDP	0.5 μ M	1 days
第 4 章 2.6	S3, CisR	CDDP	1 mM	15 min

これらのサンプルは、テフロン容器にサンプルと 1 mL の濃硝酸を加え、マイクロ波湿式分解装置 ETHOS-One（マイルストーンゼネラル株式会社、神

奈川) を用いて 180°C, 10 分間で灰化した。灰化したサンプルは、超純水で 5 mL となるようにメスアップした。

9.2. ICP-MS

サンプル中の金属濃度を ICP-MS (Agilent 7700x ; Agilent Technologies 社, Santa Clara, CA, USA) で測定した。¹⁹⁵Pt の分析には ²⁰⁹Bi を内部標準物質として使用した。

10. 細胞内 ROS 量、過酸化脂質量および細胞内 Fe²⁺量の測定

細胞内 ROS 量の測定には DCFH-DA、過酸化脂質量の測定には LiperFluo、細胞内遊離 Fe²⁺の測定には FerroOrange を用いて細胞の染色を行った。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を 6 well plate に 1×10⁵ cells/dish で播種し、一晩培養した。各指定濃度の CDDP または PQ を添加し、3, 6, 12, 24 時間曝露した細胞を使用した。細胞から培地を除去し、1 mL の HBSS で洗浄した。FBS Free 培地で希釈した蛍光プローブ (DCFH-DA 0.5 μM, LiperFluo 125 nM, FerroOrange 1 μM) を 500 μL ずつ細胞に添加し、37°C, 30 分間インキュベートした。1 mL の HBSS で洗浄し、200 μL の Accutase を添加することにより細胞を剥離し、1 mL の HBSS を加えて回収した。回収した細胞は、6,000×g, 2 分間遠心することにより上清を除去し、D-PBS で再懸濁後、フローサイトメトリー (Guava easyCyte 6HT/2L ; Millipore 社, Billerica, MA, USA) で測定した。各実験で約 5×10³ cells の細胞を分析した。蛍光試薬で染色した細胞の蛍光強度を定量化するために、細胞集団を 2 群に分け、右側領域の細胞集団の割合を算出した。試薬を曝露していない各細胞をコントロールとして染色細胞の割合を相対比でグラフを作成した。

11. 細胞周期分析

細胞周期分析は、Guava Cell Cycle Reagent (Guava Technologies 社, Hayward, CA, USA) を用いて実施した。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を 6 cm dish に 5×10^5 cells/dish で播種し、一晩培養した。細胞に 5, 10, 25 μM の CDDP を 15 分間曝露し、CDDP が含まれない培地に交換し、1 日間培養した細胞を使用した。まず、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells の細胞を回収し、 $450 \times g$ で遠心分離し、上清を除去した。1 ml の氷冷 70% EtOH に再懸濁し、 4°C , 1 時間インキュベートすることにより細胞の固定を行った。細胞固定後、細胞を $450 \times g$, 5 分間遠心分離し、PBS で洗浄後、200 μL の Guava Cell Cycle Reagent で再懸濁し、 37°C , 30 分間インキュベートした。染色した細胞を回収し、フローサイトメトリー (Guava easyCyte 6HT/2L) で測定した (Fig. 9)。各実験で約 5×10^3 cells の細胞を分析した。

12. BUN および sCr の測定

血漿中の血中尿素窒素 (BUN) は、DetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Arbor Assay 社, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。96 well plate に 50 μL のサンプルを加え、1 well あたり 75 μL の Reagent A と Reagent B を加えた。室温, 30 分間反応させた。450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー Multiskan FC によって測定し、付属のスタンダード溶液から検量線を作成し、各サンプルの BUN 値を算出した。

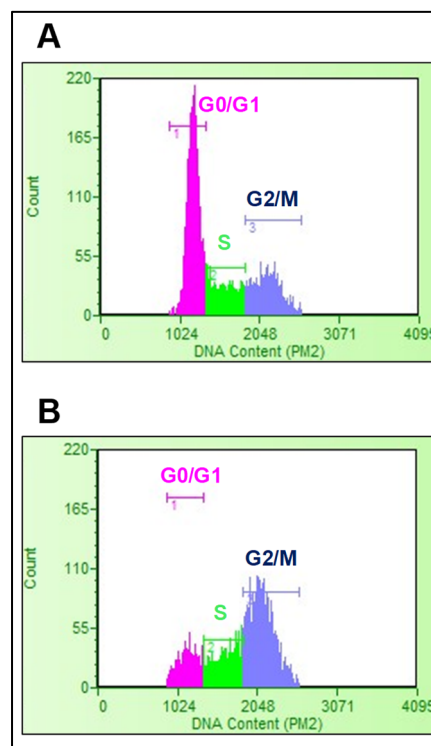


Fig. 9 細胞周期の測定

S3細胞に CDDP (25 μM) を 15 分間曝露後、24 時間培養した。Cell Cycle Reagent で染色した細胞をフローサイトメトリーで測定した際のヒストグラムを示す。

A. CDDP 未処理細胞

B. 25 μM CDDP

赤：G0/G1期、緑：S期、青：G2/M期

血清クレアチニン (sCr) は、LabAssay Creatinine Kit (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて測定した。1.5 mL エッペンチューブに 50 μ L のサンプルを加え、300 μ L の除タンパク試薬をボルテックスにより十分攪拌し、室温、10 分間静置した。600 \times g, 10 分間遠心分離し、100 μ L の上清を 96 well plate に加えた。50 μ L のピクリン酸試薬と 0.75 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、25~30°C, 20 分間反応させた。520 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー Multiskan FC によって測定し、付属のスタンダード溶液から検量線を作成し、各サンプルの sCr 値を算出した。

13. 細胞内グルタチオン (GSH) 量の測定

細胞内 GSH 量の測定は、主に Tanaka-Kagawa ら⁷³の方法により、チオール基と 4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt (SBD-F) を反応させ、その反応物の蛍光を測定する方法を使用した。また、この反応物は HPLC を用いて、他のチオール基を含む化合物と分離した。

細胞は、6 cm dish で培養し、細胞から培地を除去し、D-PBS で 2 回洗浄し、細胞を回収した。400 \times g, 5 分間遠心し、上清を除去することにより細胞ペレットにした。細胞に 500 μ L の 5% trichloroacetic acid (TCA) + 5 mM EDTA-2Na 溶液を加え、再懸濁した。その後、Handy Sonic UR-20P による超音波処理で細胞を破碎した。12,000 \times g, 5 分間遠心し、300 μ L の上清を回収した。回収した上清に、350 μ L の 1 M Borate buffer + 5 mM EDTA-2NA (pH 10.5) 溶液、100 μ L の 1% tri-n-butylphosphine、100 μ L の 0.2% SBD-F 溶液を加え、ボルテックスにより攪拌した後、60°C, 30 分間反応させた。その後、50 μ L の 4 M HCl を加え、反応を終了させ、フィルター (pore size 0.45 μ m) (Sartorius Stedim Biotech 社, Göttingen, Germany) でろ過後、サンプルとして使用した。サンプルは、オートサンプラー NanoSpace SI-2 3023 (大阪ソーダ株式会社, 大阪) を用いて HPLC に 10 μ L 注入し、蛍光検出器 NanoSpace SI-2 3213 (大阪ソーダ株式会社, 大阪) により、励起波長 384 nm、蛍光波長 516 nm で測

定した。カラムには、5C18-MS-II (4.6 x 150 mm) (ナカライテスク株式会社, 京都) を使用し、75 mM citrate buffer (pH 2.75) : methanol = 97 : 3 を溶媒として流速 2.0 mL/min で展開した。検量線として、還元型 GSH を標品として作成した検量線から、各サンプルの GSH 濃度を算出した。なお、超音波処理後の遠心分離の上清の一部は別のチューブに移し、BCA 法によるタンパク定量を行い、GSH 量の値をタンパク質量補正した。

14. DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイに使用する mRNA は、Blood / Cultured Cell Total RNA Mini Kit を用いて抽出を行った (方法については 7.1.参照)。回収した total RNA は、S3 細胞サンプルと CDDP 耐性 (CisR) 細胞サンプルを比較するアプリケーション (遺伝子発現解析 2 色法) で、スライドとして SurePrint G3 Mouse 8x60K ver.2.0 を用いた。解析は、すべてのマウス遺伝子に対して行った。マイクロアレイ解析は、北海道システム・サイエンス株式会社 (北海道) に依頼した。

15. Small interfering RNA (siRNA)

本研究に使用した siRNA の配列と購入会社を下記に示す。

siRNA	メーカー	配列 (5' → 3')	
<i>SeP</i>	ニッポン ジーン	Sence	GCCAUUAAGAUCGCUUACUD dTdT
		Antisence	AGUAAGCGAUCUAAAUGGCD dTdT

siRNA は、RNase free water で 50 μ M となるように調整し、 -20°C で保存した。siRNA の導入は、Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific 社) により、製造者のプロトコルに従って行った。S3 細胞を 5×10^5 cells/dish で 6 cm dish、もしくは 5×10^4 cells/well で 96 well plate に播種すると同時に、siRNA を遺伝子導入した。トランスフェクション培地 (OPTI-MEM) に

Lipofectamine RNAiMAX と siRNA を適量加え、室温、10~15 分間静置することでトランスフェクション複合体の形成を促した。複合体を細胞に添加し、24 時間培養して siRNA を細胞に遺伝子導入した。その後、各種実験に用いた。培地中における siRNA の最終濃度は 50 nM とした。各 dish・plate における siRNA および Lipofectamine RNAiMAX の使用量を下表に示した。

遺伝子導入における siRNA および Lipofectamine RNAiMAX の使用量

	Medium	OPTI-MEM	RNAiMAX	siRNA
6 cm dish	5,000 μ L	1,000 μ L	20 μ L	6 μ L
96 well plate	100 μ L	20 μ L	0.36 μ L	0.12 μ L

16. 統計処理

データ解析には特に記載がない限り、3 回の独立した実験から得られた結果の平均値を用いた。図中の各平均値には、標準偏差 (SD) を併記した。統計的に有意な差異は、Statcel 3 ソフトウェア (ver. 3, 2012; OMS 出版有限会社、埼玉) を使用した一元配置分散分析 (ANOVA) およびそれに続く Tukey-Kramer 多重比較検定により決定した。各群間の差は、 $p < 0.05$ で統計的に有意であるとみなした。各化学物質の LC_{50} 値は、GraphPad PRISM8 ソフトウェアによる非線形回帰分析を使用して、生存細胞の割合と試験化合物の濃度をプロットすることにより算出した。

第1章 白金系抗がん剤による各領域由来不死化細胞間での感受性の比較

1.1. 目的

CDDP は、腎臓の近位尿細管において S3 領域特異的な毒性を引き起こす（背景 6）。しかし、CDDP による S3 領域特異的な毒性発現機構についての詳細な機序は、明らかになっていない。そこで、この領域特異的な毒性発現機構を解明するためには、近位尿細管の各領域由来の不死化細胞を用いた検討が有効な手段となる可能性がある。

近年、腎毒性の評価において、様々な新規尿中バイオマーカーが *in vivo* 試験で利用されている。Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1) および clusterin の尿中排泄量の増加は、実験動物およびヒトにおける腎障害の高感度指標として使用されている⁷⁴⁻⁷⁶。これまでに、使用されていた腎障害の指標である β_2 -ミクログロブリンの尿中排泄量の増加は、近位尿細管における再吸収障害によって引き起こされる。一方、Kim-1 と clusterin の尿中排泄量の増加は、近位尿細管細胞の損傷に応じて、これらのマーカータンパク質の発現量が増加することによって起こる^{77,78}。したがって、細胞死が起きていない培養細胞における Kim-1 や clusterin の発現量を測定することにより、通常の細胞毒性試験よりも鋭敏に腎障害を検出できる可能性がある。

本章では、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞間における白金系抗がん剤に対する感受性、腎障害マーカーの解析および細胞内蓄積量の比較を行った。また、CDDP の細胞内輸送に関与するトランスポーターの発現量を細胞間で比較した。これらの検討から、不死化した S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いて、白金系抗がん剤の領域特異的な毒性を *in vitro* で評価できる実験系の樹立を目指した。

1.2. 結果

1.2.1 S1細胞、S2細胞、S3細胞における白金系抗がん剤に対する感受性の比較

96 well plate に播種した S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に、白金系抗がん剤である CDDP, L-OHP, CBDCA を曝露し、1, 3, 6 日後における細胞生存率を測定した。その結果、S3 細胞ではすべての白金系抗がん剤に対して、いずれの曝露期間においても S1 細胞や S2 細胞と比較して最も高い感受性を示した (Fig. 1-1)。これらの薬剤の LC₅₀ 値を比較すると白金系抗がん剤の中でも、CDDP は、いずれの曝露期間においても最も高い毒性を示すことが検出された (Table. 1-1)。また、L-OHP または CBDCA の LC₅₀ 値は、いずれの曝露期間においても S3 細胞が S1 細胞や S2 細胞より低い値を示した。

1.2.2 白金系抗がん剤曝露による腎障害マーカーの上昇

白金系抗がん剤に 1, 3, 6 日間曝露した S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における *Kim-1* と *clusterin* の mRNA 量を測定した。この実験では、細胞毒性試験 (1.2.1) の結果に基づいて、LC₅₀ 値以下の白金系抗がん剤を曝露したため、薬剤および曝露期間ごとに異なる濃度を用いた。*Kim-1* と *clusterin* の誘導は、各細胞における未処理群との相対比で評価した。その結果、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP に曝露すると、CDDP の 1 日曝露後には *Kim-1* の mRNA 量は顕著な増加を示さなかったが、1 μM の CDDP に 3 日および 6 日間曝露したすべての細胞で、*Kim-1* の mRNA 量の増加が観察された (Fig.1-2A)。特に S3 細胞では、未処理群と比較して 20 倍以上増加した。CDDP 曝露による *clusterin* の増加率は、*Kim-1* の増加率よりも低かったが、S3 細胞では CDDP 曝露 6 日後に *clusterin* の mRNA 量の増加が観察された (Fig. 1-3A)。このように、LC₅₀ 値以下の CDDP に曝露された S3 細胞では、*Kim-1* と *clusterin* の誘導が添加後数日経過してから遅発的に誘導されることが明らかになった。CDDP と比較して、L-OHP や CBDCA は、*Kim-1* や *clusterin* の mRNA 量に一

貫性のある増減を示さなかった。L-OHP や CBDCA に 1 日および 3 日間曝露しても、*Kim-1* または *clusterin* の発現に顕著な増加は認められなかった (Fig. 1-2 and 1-3)。最大濃度の L-OHP や CBDCA に 6 日間曝露すると、*Kim-1* および *clusterin* の mRNA 量の増加が観察された。

1.2.3 白金系抗がん剤の細胞内蓄積量の比較

S3 細胞が白金系抗がん剤に対して高感受性を示す理由を明らかにするため、各曝露期間における細胞内 Pt 量を細胞間で比較した。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を 0.5 μ M の CDDP, L-OHP, CBDCA で 1, 3, 6 日間曝露し、回収した細胞内 Pt 量を ICP-MS で測定した。その結果、CDDP を 6 日間曝露した際の S3 細胞では、S1 細胞や S2 細胞と比較して高い細胞内 Pt 量を検出した (Fig. 1-4A)。しかし、CDDP を 1, 3 日間曝露した際の S3 細胞における細胞内 Pt 量は、S1 細胞や S2 細胞と比較して高い値を示さなかった。CDDP を 6 日間曝露した際に S3 細胞で高感受性を示したこと (Fig. 1-1A) は、S3 細胞において高い細胞内 Pt 量を示したことに一部起因する可能性が考えられるが、CDDP の感受性 (Fig. 1-1A) と *Kim-1* の発現 (Fig. 1-2A) が CDDP を 1, 3 日間曝露した際においても S3 細胞で最も高値を示したことを考慮すると、細胞内 Pt 量の差では S3 細胞における CDDP の高感受性を説明できないと考えられた。L-OHP 曝露後の S3 細胞での細胞内 Pt 量は、1, 3, 6 日曝露後の S1 細胞や S2 細胞の細胞内 Pt 量と比較して高い値を示さなかった (Fig. 1-4B)。また、CBDCA 曝露後の S3 細胞での細胞内 Pt 蓄積量は、1, 3 日曝露後の S1 細胞や S2 細胞の細胞内 Pt 量より高い値を示した (Fig. 1-4C)。

1.2.4 CDDP の輸送に関与する輸送体タンパク質発現量の比較

CDDP の輸送に関与することが報告されている輸送体である OCT2, Ctr1, MATE1 のタンパク質発現量を測定した (Fig. 1-5) (背景 3)。CDDP の取り込みに関与する OCT2 と Ctr1 の発現量を細胞間で比較したところ、S3 細胞で高い発現量を示さなかった。また、CDDP の排泄に関与する MATE1 の発現量は、S3 細胞で低い発現量を示したことから、MATE1 が CDDP の 6 日間曝露における S3 細胞での細胞内 Pt 量の高さに一部関与している可能性が考えられた。

1.3. 考察

本研究は、CDDP, L-OHP, CBDCA の領域特異的毒性を腎臓近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来の培養細胞株を用いて比較・検討した初めての研究である。本章では、不死化した S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いて、白金系抗がん剤の領域特異的毒性を *in vitro* で評価できる実験系の樹立を目指し、以下の検討に取り組んだ。

1. 細胞毒性試験（*AlamarBlue* 法および腎障害マーカーの解析）による白金系抗がん剤に対する感受性の比較
2. 白金系抗がん剤曝露による細胞内蓄積量の比較
3. CDDP の細胞内輸送に関与するトランスポーターの発現量の比較

これらの検討から、実験動物で観察されていた CDDP の近位尿細管 S3 領域特異的毒性を近位尿細管の各領域から不死化して得られた S3 細胞においても検出できることが明らかとなった。

1. 細胞毒性試験（*AlamarBlue* 法および腎障害マーカーの解析）による白金系抗がん剤に対する感受性の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を曝露した際の細胞毒性試験の結果から、S3 細胞が CDDP に最も高い感受性を示した (Fig. 1-1, Table. 1-1)。また、S3 細胞に LC₅₀ 値以下の CDDP を 3 日および 6 日間曝露すると *Kim-1* が、6 日間曝露すると *clusterin* が顕著に誘導された (Fig. 1-2 and 1-3)。これまで、CDDP を実験動物に投与した多くの研究から、最も顕著な腎臓組織における病理学的変化は、近位尿細管の S3 領域が多く存在する腎臓の皮質と髄質の境界領域で起こることが分かっている^{23,79}。これらの病理学的変化は、CDDP の投与後 3~5 日で観察された^{23,79,80}。このことから、本研究で観察された *Kim-1* および *clusterin* の誘導によって検出される S3 細胞における CDDP の遅発性毒性は、実験動物における CDDP の遅発性毒性を再現していると思われる (遅発性毒性については、第 3 章参照)。

L-OHP や CBDCA は、臨床的に腎障害を引き起こすが^{81,82}、L-OHP や CBDCA が近位尿細管における領域特異的毒性を示すのかは不明である。本章における *in vitro* 研究では、S3 細胞が L-OHP または CBDCA に対して高感受性を示した。さらに、これらの薬剤を LC₅₀ 値以下の濃度で曝露することによる *Kim-1* および *clusterin* の増加率は、CDDP と比較して増加率が小さいことから、CDDP は L-OHP や CBDCA と比較すると、S3 領域に対して強い障害を与える可能性が示唆された。これまでに、CDDP の細胞毒性には ROS 産生が関与していることが知られていることから⁸³⁻⁸⁵、L-OHP と CBDCA が ROS 産生を誘導するのか、ROS に対する感受性がこれらの細胞間で異なるかについて、今後の研究で明らかにする必要がある（CDDP による ROS の関与についての検討は、第 2 章参照）。

腎臓の S3 領域は、解剖学的に血管が少ないことが特徴であり、そのため酸素濃度が低く、様々な腎ストレスに対して脆弱である^{86,87}。しかし、培養条件下で行われた本研究の結果においても、S3 細胞が白金系抗がん剤に対して最も高い感受性を示したことから、S3 細胞の白金系抗がん剤に対する高感受性には、解剖学的要因ではなく、各領域由来不死化細胞の特性が関与している可能性が示唆された。

2. 白金系抗がん剤曝露による細胞内蓄積量の比較

S3 細胞が白金系抗がん剤に対して高感受性を示す理由を明らかにするため、各曝露期間における細胞内 Pt 量を細胞間で比較した。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における白金系抗がん剤に対する細胞毒性試験（Fig. 1-1, Table. 1-1）および細胞内蓄積量（Fig. 1-4）の結果から、S3 細胞における CDDP の 6 日間曝露や CBDCA の 1 日および 6 日間曝露では、高感受性と蓄積量の高さが一致していた。一方、その他の各薬剤の曝露期間では、S3 細胞における高感受性と細胞内蓄積量が、必ずしも一致するわけではなかった。このことから、白金系抗がん剤による S3 細胞の高感受性は、CDDP の 6 日間曝露や CBDCA

の 1 日および 6 日間曝露では、蓄積量が関与していることが示唆されたが、その他の各薬剤の曝露期間における高感受性は蓄積量の差では説明できないことが考えられた。

3. CDDP の細胞内輸送に関与するトランスポーターの発現量の比較

次に、細胞間における CDDP の細胞内輸送に関与するトランスポーターのタンパク質発現量を比較した。まず、CDDP の取り込みに関与する OCT2 と Ctr1 のタンパク質発現量を細胞間で比較したところ、S3 細胞において高い発現量は検出されなかった (Fig. 1-5)。このことから、CDDP の 6 日間曝露における S3 細胞での高い細胞内 Pt 量は、これら輸送体による CDDP の取り込みが亢進している可能性は低い。一方、CDDP の排泄に関与する MATE1 のタンパク質発現量が S3 細胞で低い発現量を示したことから、CDDP の 6 日曝露における S3 細胞での高い細胞内 Pt 量が検出されたことに寄与している可能性が示唆された。また、L-OHP の細胞内輸送にも OCT2, Ctr1, MATE1 が関与していることが報告されている^{47,88}。L-OHP は、いずれの曝露期間においても S3 細胞で蓄積量が高くなっていないことから、細胞間におけるこれらの輸送体の発現量だけでは、細胞内蓄積について説明できない可能性がある。さらに、CBDCA の細胞内輸送には、Ctr1 が関与していることが報告されている^{44,88,89}。前述したように、Ctr1 のタンパク質発現量が各細胞間で変化が見られなかったため (Fig. 1-5)、CBDCA の 1 日間曝露での S3 細胞における高蓄積には、Ctr1 の発現量以外の要因が関与していると考えられる。これら培養細胞株における白金系抗がん剤の蓄積に関与する輸送体の機能解析については、さらなる検討が必要である。

本章の結果から、実験動物で観察されていた CDDP の近位尿細管 S3 領域特異的毒性は、近位尿細管の各領域から不死化して得られた S3 細胞においても検出された。また、この CDDP による領域特異的な高感受性は、細胞内 Pt 量

の差では説明できず、その他の要因が関与している可能性を示すものであった。そこで次章より、CDDP 曝露後の細胞間での応答性の違いを比較し、CDDP 腎障害の解明を目指した。

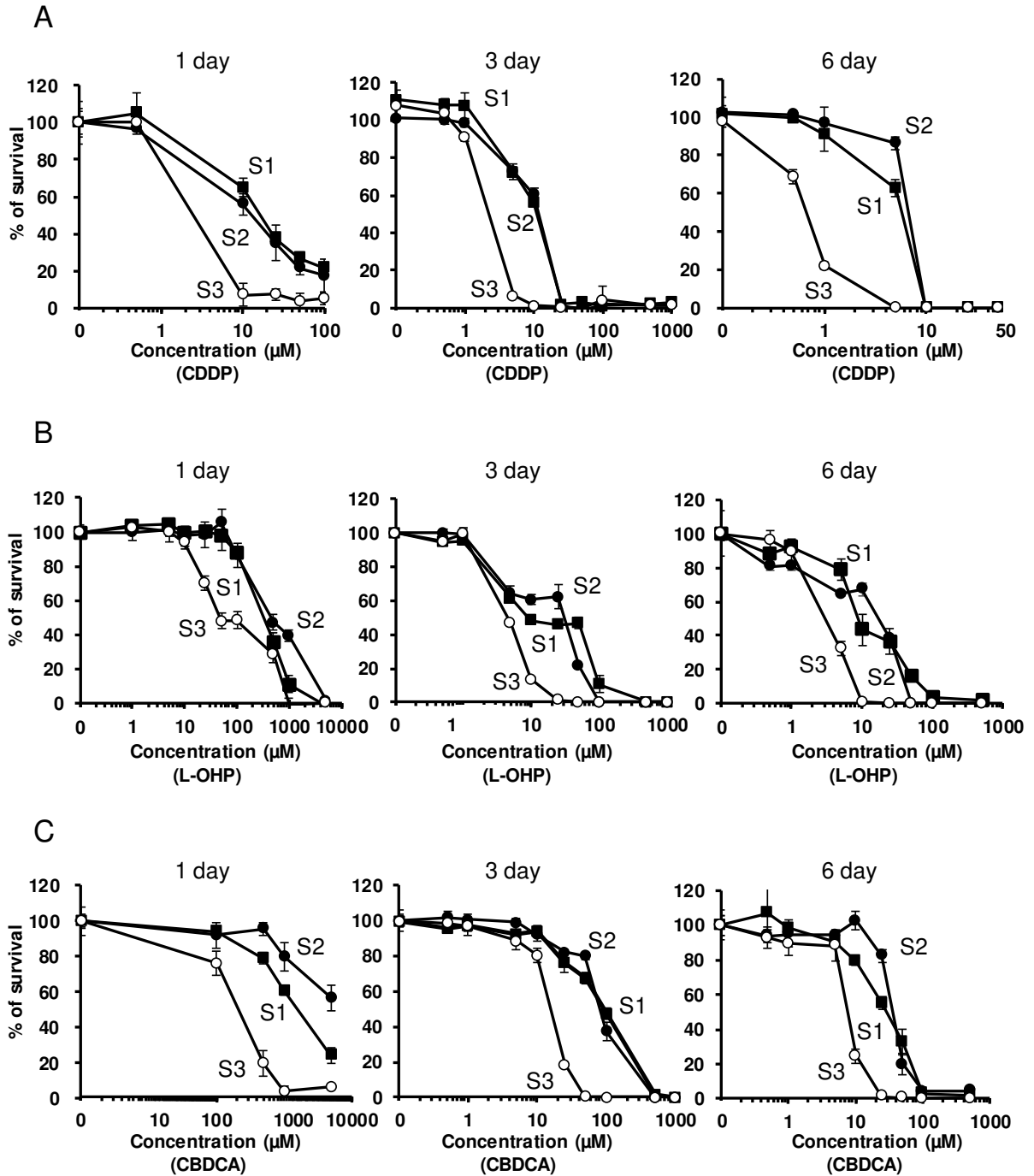


Fig. 1-1. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における白金系抗がん剤に対する感受性の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (A) ,L-OHP (B) ,CBDCA (C) を 1,3,6 日間曝露し、
 alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。データは、6 回の独立した実験から
 得られた平均値±SD を示している。 S1 細胞 (■)、S2 細胞 (●)、S3 細胞 (○)

Table. 1-1**S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における白金系抗がん剤に対する LC₅₀ 値の比較**

Exposure days	Pt agents	Cells		
		S1 (μM)	S2 (μM)	S3 (μM)
1	CDDP	12.0 ± 3.19	13.7 ± 5.66	7.23 ± 1.34
	L-OHP	379 ± 27.9	424 ± 23.8	59.9 ± 22.4 ^{a, b}
	CBDCA	2200 ± 691	5280 ± 221 ^a	286 ± 39.4 ^{a, b}
3	CDDP	10.1 ± 0.05	9.99 ± 0.06	1.70 ± 0.13 ^{a, b}
	L-OHP	9.98 ± 0.04	25.2 ± 0.12 ^a	4.95 ± 0.02 ^{a, b}
	CBDCA	100 ± 0.0216	93.2 ± 4.14	13.3 ± 6.21 ^{a, b}
6	CDDP	5.17 ± 0.08	5.60 ± 0.23 ^a	0.83 ± 0.03 ^{a, b}
	L-OHP	9.88 ± 0.21	24.8 ± 0.02 ^a	4.73 ± 0.07 ^{a, b}
	CBDCA	25.1 ± 0.13	35.1 ± 13.1	9.53 ± 0.10 ^{a, b}

^a Significantly different from S1 cells at $p < 0.01$.

^b Significantly different from S2 cells at $p < 0.01$.

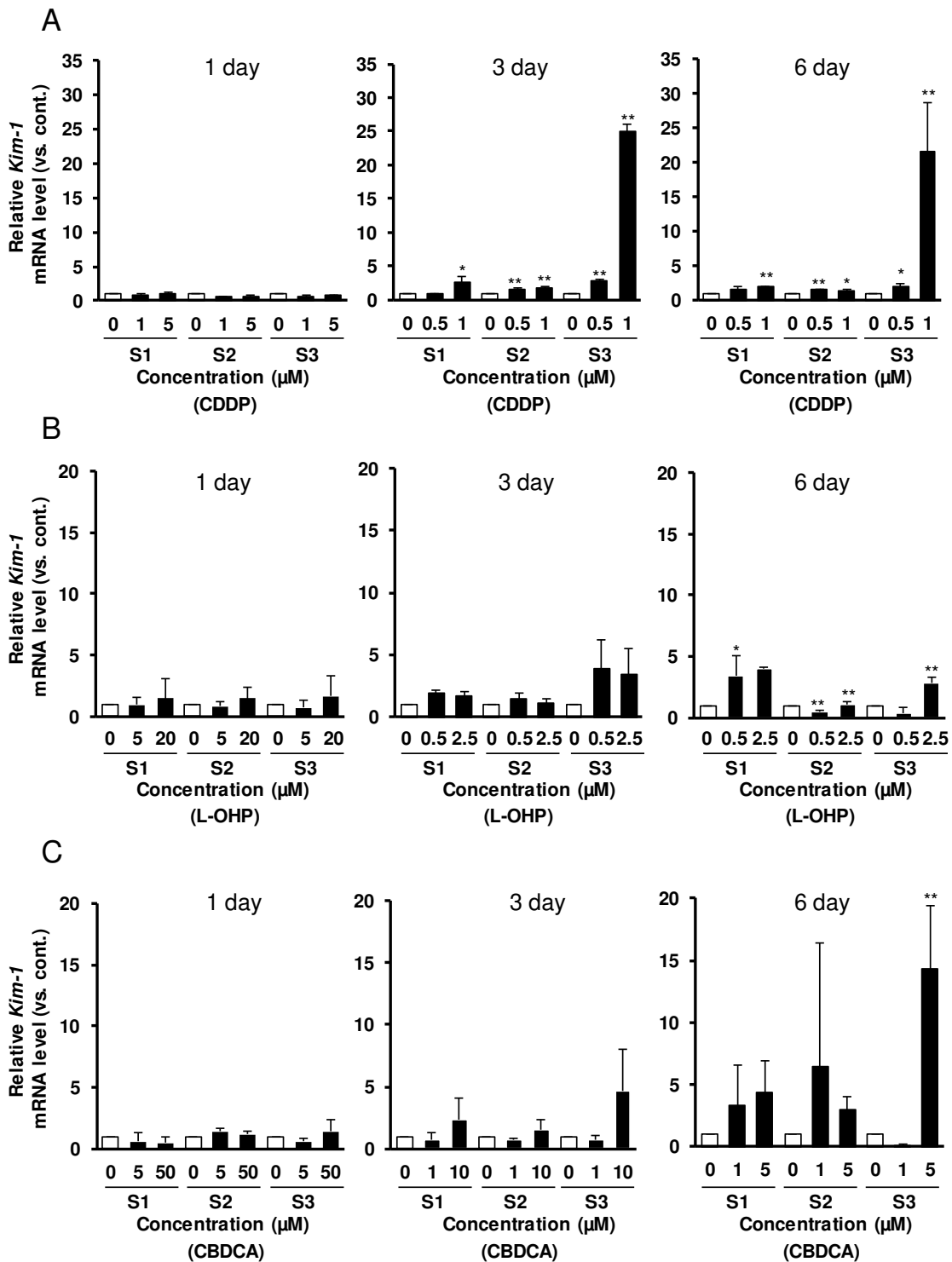


Fig. 1-2. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における白金系抗がん剤による

Kim-1 の誘導

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (A) , L-OHP (B) , CBDCA (C) で 1, 3, 6 日間曝露した。Kim-1 mRNA の発現を RT-qPCR で測定した。グラフは、各未処理細胞に対する Kim-1 mRNA の相対比を示している。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。 **Significantly different at $p < 0.01$, *Significantly different at $p < 0.05$

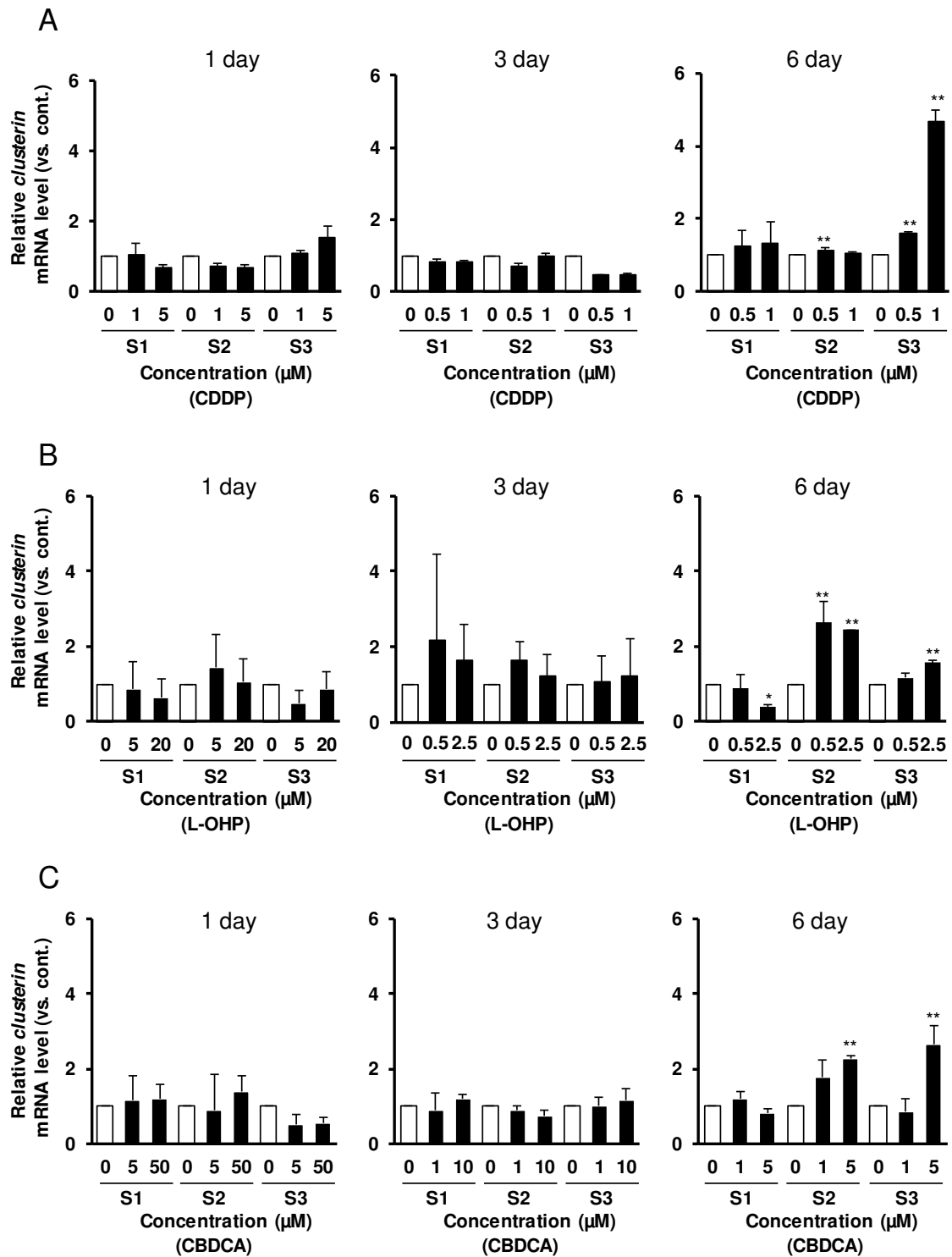


Fig. 1-3. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における白金系抗がん剤による *clusterin* の誘導

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (A) , L-OHP (B) , CBDCA (C) で 1, 3, 6 日間曝露した。*clusterin* mRNA の発現を RT-qPCR で測定した。グラフは、各未処理細胞に対する *clusterin* mRNA の相対比を示している。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 \pm SD を示している。 **Significantly different at $p < 0.01$

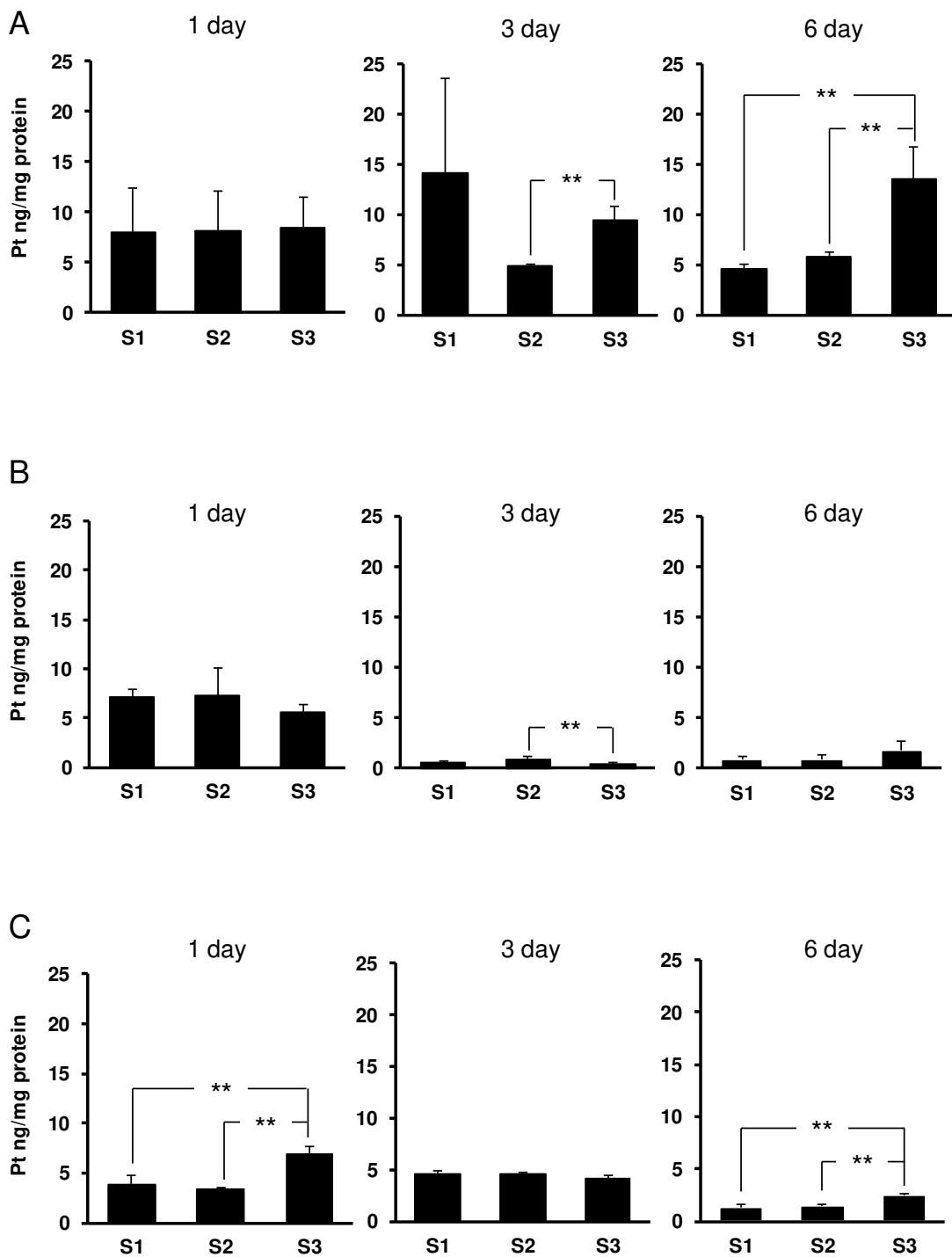


Fig. 1-4. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における細胞内 Pt 量の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を 0.5 μ M の CDDP (A) , L-OHP (B) , CBDCA (C) で 1, 3, 6 日間曝露した。細胞内 Pt 量は、湿式灰化後に ICP-MS で測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 \pm SD を示している。 **Significantly different at $p < 0.01$

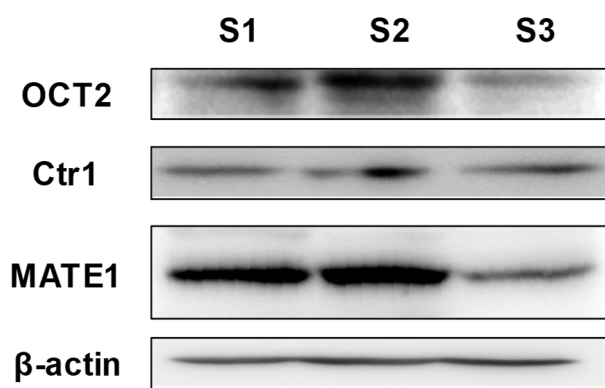


Fig. 1-5. 白金系抗がん剤の輸送に関与する輸送体の発現量の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の全細胞溶解液を用いて、OCT2, Ctr1, MATE1, β -actin のタンパク質発現量をウエスタンブロット法によって測定した。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。

第2章 S3細胞における CDDP 高感受性にフェロトーシスが関与する

2.1. 目的

第1章から、CDDPがS3細胞において高感受性を示すことが明らかとなった。この高感受性の機序を解明するため、ROSに着目した検討に取り組んだ。CDDP腎障害によるアポトーシスやネクローシスには、ROSの増加による酸化ストレスの亢進が関与していることが報告されている（背景4.2）^{90,91}。さらに、CDDP腎障害では、鉄を介した過酸化脂質の蓄積によって引き起こされるフェロトーシスが観察されている（背景5）^{92,93}。しかし、CDDP曝露による細胞毒性において、近位尿細管細胞のどの領域で、どのような種類の細胞死が起こるかについては明らかになっていない。

本章では、S1細胞、S2細胞、S3細胞を用いて、S3細胞がROS関連物質に対しても脆弱であるのか調べ、CDDPに対するS3細胞の高感受性の機序を明らかにするために、酸化ストレスに着目した検討を行った。

2.2. 結果

2.2.1 S1細胞、S2細胞、S3細胞におけるROS関連物質に対する

感受性の比較

S1細胞、S2細胞、S3細胞に酸化還元サイクルによりROSを産生するパラコート（PQ）、3種類の活性酸素物質（過酸化水素： H_2O_2 、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド：*t*-BHP、クメンヒドロペルオキシド：CHP）をそれぞれ24時間曝露し、細胞生存率を比較した。その結果、CDDPを含む全てのROS関連物質においてS3細胞は、S1細胞やS2細胞と比較して高い感受性を示した（Fig. 2-1）。算出した LC_{50} 値を比較すると、S3細胞におけるCDDPの細胞毒性は、S1細胞やS2細胞より10~15倍高い値を検出した。また、S3細胞におけるPQまたは3種類の活性酸素物質の細胞毒性は、S1細胞やS2細胞における細胞毒性よりも2~3倍高い値を検出した（Table. 2-1）。このように、

CDDP による高感受性は、いずれの ROS 関連物質より顕著であった。そこで、CDDP による S3 細胞の高感受性には、ROS に関連したその他の要因が関与するのではないかと考えた。以降の実験では、S3 細胞に対する CDDP の高感受性に関わる機序を検討するため、ROS そのものではなく、細胞内で ROS を産生することにより毒性を示すことが既に知られている PQ を比較対象として検討を行った。また、CDDP と PQ の濃度は、Fig. 2-1A, B において LC₅₀ 値以下の濃度を使用した。

2.2.2 CDDP または PQ 曝露後の細胞内 ROS 量の経時的な測定

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP または PQ に 3, 6, 12, 24 時間曝露した後の細胞内 ROS 量を測定した。その結果、CDDP または PQ に 3, 6, 12 時間曝露したいずれの細胞においても、細胞内 ROS 量に顕著な増加は検出されなかった (Fig. 2-2A, B)。しかし、CDDP に 24 時間曝露された S3 細胞では、S1 細胞や S2 細胞と比較して高い細胞内 ROS 量の増加が検出された (Fig. 2-2A)。また、PQ に 24 時間曝露された S1 細胞や S2 細胞では細胞内 ROS 量は増加しなかったが、S3 細胞では細胞内 ROS 量が増加した (Fig. 2-2B)。

2.2.3 CDDP または PQ 曝露後の過酸化脂質量の測定

細胞内で発生した ROS は、細胞膜などに多く含まれる多価不飽和脂肪酸を過酸化することが知られている。そこで、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (3 μ M) または PQ (125 μ M) に 24 時間曝露した後の細胞内過酸化脂質量を測定した (Fig. 2-3)。その結果、CDDP または PQ に曝露されたすべての細胞で過酸化脂質量が増加したが、S3 細胞への CDDP 曝露後の細胞内過酸化脂質量の増加率は、S1 細胞や S2 細胞と比較して高い値を示した。一方、PQ 曝露後の細胞内過酸化脂質量の増加率は、S3 細胞において特異的に高い値にはならなかった。

2.2.4 抗酸化剤 Trolox 処理の効果

S3 細胞の CDDP と PQ への高感受性における ROS の関与を検討するため、S3 細胞を CDDP または PQ に曝露する際に抗酸化剤であるビタミン E 誘導体 Trolox (100 μ M) を同時添加した。その結果、Trolox は CDDP と PQ の細胞毒性を抑制した (Fig. 2-4A, B)。また、Trolox によって細胞内 ROS 量と過酸化脂質量の増加も抑制された (Fig. 2-4C, D)。これらの結果から、S3 細胞における CDDP と PQ に対する高感受性には、細胞内で発生した ROS が関与していることが示唆された。

2.2.5 CDDP または PQ 曝露後の NOX4 タンパク質発現量の比較

Fig. 2-2, 2-3 に示したように、CDDP や PQ の曝露に対する細胞内 ROS 量および過酸化脂質量の増加は、S3 細胞において S1 細胞や S2 細胞と比較して高い値を示した。そこで、ROS を産生する酵素である NOX4 のタンパク質発現量を比較した (Fig. 2-5)。その結果、NOX4 タンパク質はすべての細胞で等しく発現しており、CDDP または PQ 曝露による発現量の変化は認められなかった。

2.2.6 CDDP または PQ 曝露後の抗酸化タンパク質発現量の比較

次に、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP または PQ に曝露した後の抗酸化タンパク質 (Peroxioredoxin 1 : Prx1, Thioredoxin : Trx, Thioredoxin reductase 1 : TrxR1, Glutathione peroxidase 4 : GPX4) (背景 4.2) の発現量を比較した。Prx1 のタンパク質発現量に関しては、すべての細胞で等しく発現しており S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP または PQ を曝露しても、顕著な変化は認められなかった。S3 細胞では、3 μ M の CDDP を 6, 24 時間曝露後に、Trx および TrxR1 のタンパク質発現量が低下した (Fig. 2-6A)。さらに、3 μ M の CDDP に 24 時間曝露した S3 細胞では、GPX4 のタンパク質発現量も低下した (Fig. 2-6A)。一方、S3 細胞を PQ に 24 時間曝露したところ、Trx, TrxR1, GPX4 の

タンパク質発現量は増加した (Fig. 2-6B)。これらの結果は、S3 細胞における CDDP の感受性が PQ よりも高いことに、CDDP 曝露による抗酸化タンパク質の発現量低下が関与していることを示唆している。

2.2.7 CDDP 曝露後の細胞内 GSH 量の比較

生体内還元物質であるグルタチオン (GSH) は、ROS の除去 (抗酸化) に重要な分子である。そこで、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を 24 時間曝露した際の GSH 濃度を測定したところ、S3 細胞では CDDP 曝露によって細胞内 GSH 量が増加する傾向がみられたが、有意な差にはならなかった (Fig. 2-7A)。また、S3 細胞に GSH を減少させる Buthionine-sulfoximine (BSO) を添加し、CDDP による細胞生存率を測定した (Fig. 2-7B)。その結果、BSO 処理の有無による CDDP の感受性に変化は見られなかった。

2.2.8 CDDP または PQ 曝露後の細胞内 Fe²⁺量の比較

細胞内で生じた H₂O₂ は、細胞内 Fe²⁺の存在下でフェントン反応によって、酸化力のより強いヒドロキシラジカルに変換される⁹⁴。そこで、遊離 Fe²⁺検出プローブ (FerroOrange) による染色後、フローサイトメトリーを用いて、CDDP (3 μM) または PQ (125 μM) の曝露 24 時間後の細胞内 Fe²⁺量を測定した。その結果、CDDP 曝露により、S3 細胞は S1 細胞や S2 細胞と比較して細胞内 Fe²⁺量が増加した (Fig. 2-8A)。一方、PQ 曝露により、いずれの細胞においても細胞内 Fe²⁺量が増加する傾向がみられたが、S1 細胞や S2 細胞と比較して、S3 細胞における顕著な増加は検出されなかった。(Fig. 2-8B)。

2.2.9 CDDP 曝露後の SLC39A8 (ZIP8) タンパク質発現量の比較

Fig. 2-8A に示したように、CDDP を 24 時間曝露した S3 細胞において遊離 Fe²⁺量が特異的に増加した。細胞内への遊離 Fe²⁺の取り込みに関与している輸送体として ZIP8 が知られている。そこで、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に

CDDP を 24 時間曝露した際の ZIP8 のタンパク質発現量を比較した (Fig. 2-9)。その結果、CDDP 曝露によって S3 細胞においてのみ ZIP8 のタンパク質発現量が増加した。このことから、S3 細胞における CDDP 曝露による遊離 Fe^{2+} 量の増加に、ZIP8 が一部関与している可能性が示唆された。

2.2.10 フェロトーシス阻害剤処理の効果

S3 細胞に CDDP を曝露することにより、細胞内 ROS 量、過酸化脂質量および遊離 Fe^{2+} 量の増加、GPX4 タンパク質発現量の低下を検出したことから、CDDP に曝露された S3 細胞では、鉄を介した細胞死であるフェロトーシスが誘導されている可能性が示唆された。CDDP による S3 細胞における高感受性に、フェロトーシスが関与しているか検討するため、フェロトーシス阻害剤である Fer-1 および DFO を用いて検討した。DFO は、低濃度 (30 μM 以下) では細胞外の鉄とキレートを形成することが知られているが、高濃度 (100 μM 以上) では細胞内鉄とキレートを形成することが報告されている⁹⁵。そこで、100 μM の DFO を用いて細胞内鉄とキレートを形成させることにより、CDDP による S3 細胞の高感受性がフェロトーシスに関連しているのか検討した。その結果、S3 細胞に対する CDDP の細胞毒性は、Fer-1 (30 μM) や DFO (100 μM) の 2 時間前処理により阻害された (Fig. 2-10A, C)。この際、CDDP による過酸化脂質量の増加は、Fer-1 や DFO の前処理により抑制された (Fig. 2-10E)。一方、PQ による細胞毒性および過酸化脂質量の増加は、フェロトーシス阻害剤の影響を受けなかった (Fig. 2-10B, D)。これらの結果から、CDDP による S3 細胞への高感受性にフェロトーシスが関与していることが示唆された。また、PQ による細胞死には、フェロトーシス以外の細胞死の関与が示唆された。

2.3. 考察

本章では、CDDP に対する S3 細胞の高感受性に ROS が関与するのか検討するために、以下の検討に取り組んだ。

1. 細胞間における ROS 関連物質に対する感受性の比較
2. ROS の産生系および消去系に関与するタンパク質群の発現量の比較
3. ROS の増強に関与する細胞内遊離 Fe^{2+} 量の測定
4. フェロトーシス阻害剤を用いた検討

これらの検討から、CDDP に曝露された S3 細胞では、様々な細胞応答を介してフェロトーシスが誘導されることを明らかにした。

1. 細胞間における ROS 関連物質に対する感受性の比較

CDDP 腎障害の原因の一つとして ROS の関与が報告されている^{83,85,96,97}。本章の結果から、S3 細胞は S1 細胞や S2 細胞と比較して、CDDP だけではなく PQ や 3 種類の活性酸素物質 (H_2O_2 , t-BHP, CHP) といった ROS 関連物質に対して高感受性を示した (Fig. 2-1)。また、抗酸化剤である Trolox の処理は、CDDP または PQ 曝露による細胞毒性を抑制させたことから、CDDP または PQ 曝露による細胞内 ROS 産生が S3 細胞の高感受性に関与していることが示唆された (Fig. 2-4)。

2. ROS の産生系および消去系に関与するタンパク質群の発現量の比較

細胞内における ROS 存在量は、産生系と消去系のバランスにより調整されていることから、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を曝露した際の、これらタンパク質群の発現量の比較を行った。

始めに、ROS の産生に関わる NADPH オキシダーゼに着目した。NADPH オキシダーゼは、ROS を産生する酵素であり⁹⁸、培養細胞や実験動物を用いたいくつかの研究から、NADPH オキシダーゼ由来の ROS が CDDP による腎障害を含む様々な障害に関与することが報告されている^{99,100}。NADPH オキシダ

ーゼのサブタイプである NOX4 のタンパク質発現量を比較したところ、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞のいずれの細胞においても、CDDP 曝露による発現量の変化は認められなかった (Fig. 2-5)。このことから、S3 細胞における CDDP 曝露による細胞内 ROS 量の増加には、NOX4 が関与していない可能性が考えられた。

次に、ROS の消去に関与する酵素群である Trx, TrxR1, Prx1, GPX4 といった抗酸化タンパク質に着目した (背景 4.2) ^{101,102}。これらのタンパク質の遺伝子発現量や酵素活性の低下は、CDDP による細胞内 ROS 量増加に関与することが考えられる ¹⁰³。本章の結果では、S3 細胞において、CDDP の 6 時間曝露から Trx, TrxR1 の発現量が減少し、CDDP の 24 時間曝露から GPX4 の発現量が減少した (Fig. 2-6A)。S3 細胞においてのみこれらの抗酸化タンパク質が減少した原因については、今後の研究課題である。また、タンパク質のチオール基およびセレノチオール基は、CDDP による結合の標的となり、これらの酵素活性が阻害されることが示されている ¹⁰⁴。CDDP がこれらの抗酸化タンパク質の発現量を減少させるだけでなく、結合を介して酵素活性を阻害している場合、細胞内 ROS 量および過酸化脂質量を増加させ、S3 細胞の CDDP に対する感受性を増加させた可能性が考えられる。

CDDP に対する反応とは異なり、PQ では 24 時間曝露において抗酸化タンパク質の発現量がいずれの細胞においても増加した (Fig. 2-6B)。山本ら ¹⁰⁵ は、これら一連の抗酸化タンパク質の発現が Keap1 / Nrf2 システムにより制御されていることを報告している。このことから、PQ 曝露により Keap1 / Nrf2 システムの活性化を介して抗酸化タンパク質の発現量が増加した結果、ROS 除去能が活性化されたことを示唆している ¹⁰⁶。PQ による ROS 除去系の活性化は、PQ 曝露が CDDP 曝露と比較して、感受性 (Fig. 2-1A, B) や過酸化脂質量の増加 (Fig. 2-3A, B) が、あまり顕著ではないことに関連している可能性がある。一方、CDDP 曝露によっても Keap1/Nrf2 システムが活性化することが報告されている ¹⁰⁷ が、本章の結果では抗酸化タンパク質量の増加は

検出されなかった。この理由として、S3細胞へのCDDP曝露によってユビキチン-プロテアソームシステムのようなタンパク質分解システムが活性化し、そのタンパク質分解がNrf2活性化によって引き起こされる抗酸化タンパク質の産生を上回っている可能性も考えられる。今後、CDDP曝露によるS1細胞、S2細胞、S3細胞におけるNrf2の活性化およびタンパク質分解システムに着目した比較・検討が必要である。

3. ROSの増強に関与する細胞内遊離Fe²⁺量の測定

細胞内で生じたH₂O₂は、細胞内Fe²⁺の存在下でフェントン反応によって、酸化力のより強いヒドロキシラジカルに変換される⁹⁴。これまでに、実験動物を用いた研究論文から、CDDP投与により腎臓組織中のFe²⁺量が増加することが報告されている⁹³。本章の結果から、細胞にCDDP曝露することにより細胞内遊離Fe²⁺量がS3細胞で特異的に増加することを明らかにした(Fig. 2-8A)。細胞内へのFe²⁺の取り込みには、DMT1, ZIP8, ZIP14などの輸送体が関与している¹⁰⁸。マウスの腎臓におけるこれらの輸送体の発現量を*in situ*ハイブリダイゼーション法によって調べた研究では、ZIP8が近位尿細管のS3領域付近で高発現することが示されている¹⁰⁹。本研究では、細胞へCDDP曝露した際にZIP8のタンパク質発現量が、S3細胞においてのみ増加することを見出した(Fig. 2-9)。S3細胞におけるCDDPに対する高感受性にZIP8の発現上昇を介したFe²⁺の流入と、それに伴うフェントン反応を介しヒドロキシラジカルの産生⁹⁴が増加したことが関与している可能性が示唆された。一方、CDDP曝露によってS3細胞においてFe³⁺からFe²⁺への還元が促進された可能性も考えられる。今後の検討課題としては、細胞内においてFe³⁺は、エンドソーム内で還元酵素であるsix-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 (STEAP3)によってFe²⁺へ還元されることから^{110,111}、CDDP曝露におけるSTEAP3の発現量および活性について細胞間での比較・検討を行うことでFe³⁺の還元が促進されたかについて明らかになるとと思われる。培養細胞を用

いた実験で ZIP8 は、転写因子 NF- κ B により発現が制御されていることが知られている¹¹²ことから、本研究で明らかとなった S3 細胞における ZIP8 の発現上昇に NF- κ B の関与が考えられる。一方、マウスへの CDDP 投与による NF- κ B の増加が腎障害に関与することが報告されており^{113,114}、その際に ZIP8 の発現が上昇しているのか、またそれらの事象が S3 領域で起こっているのかについては今後検討すべき課題である。

4. フェロトーシス阻害剤を用いた検討

フェロトーシスは、GSH の枯渇、GPX4 活性の低下、および細胞内多価不飽和脂肪酸の過酸化を伴う反応として知られている^{115,116}。本研究では、CDDP 曝露によって S3 細胞では、過酸化脂質量が増加 (Fig. 2-3A) し、GPX4 のタンパク質発現量が減少することが示された (Fig. 2-6A)。これまでに、CDDP 腎障害にフェロトーシスが関与していることがいくつかの研究論文で報告されている^{92,93,117}。そこで、フェロトーシス阻害剤を用いて、CDDP による S3 細胞への細胞毒性にフェロトーシスが関与しているのか検討を行った。その結果、Fer-1 や DFO といったフェロトーシス阻害剤によって、CDDP による細胞毒性が抑制された (Fig. 2-10A, C)。さらに、フェロトーシス阻害剤としても知られている抗酸化剤である Trolox^{61,118}によっても、CDDP による細胞毒性は軽減された (Fig. 2-4A)。これらの結果は、S3 細胞では CDDP 曝露によって遊離 Fe²⁺量の増加と GPX4 タンパク質の発現量の低下によって、フェロトーシスが誘導されたことを示唆している。しかし、CDDP による細胞死としてアポトーシスやネクローシスについての報告もあることから、CDDP による S3 細胞における高感受性がどの細胞死によるものなのか、各細胞死の阻害剤を用いて詳細な検討を行う必要がある。

Yang ら¹¹⁹は、PQ による肺毒性に着目し、PQ 曝露がフェロトーシスを誘導することを報告している。しかし、本研究で用いた腎臓由来の細胞では、PQ 曝露によって GPX4 タンパク質の発現増加 (Fig. 2-6B) を示し、CDDP と比

較して過酸化脂質の増加が比較的小さいことから、PQ曝露によるフェロトーシス誘導がS3細胞では検出されなかった可能性がある。これらの結果から、PQ曝露によるS3細胞における細胞毒性には、フェロトーシス以外のその他の細胞死が関与している可能性が示唆された。一方、神経細胞にPQ曝露を行った研究において、フェロトーシスが誘導されていないことが示されていることから¹²⁰、PQによって誘導される細胞死が臓器ごとに異なる可能性が示唆された。

本章では、CDDPに曝露されたS3細胞では、様々な細胞応答を介してフェロトーシスが誘導されることを発見した。今後の検討として、S3細胞においてCDDP曝露によって抗酸化タンパク質の発現量が減少する原因について、また、生体モデルにおいてCDDP投与によってS3領域でフェロトーシスが誘導されているのかについて検討を行う必要がある。

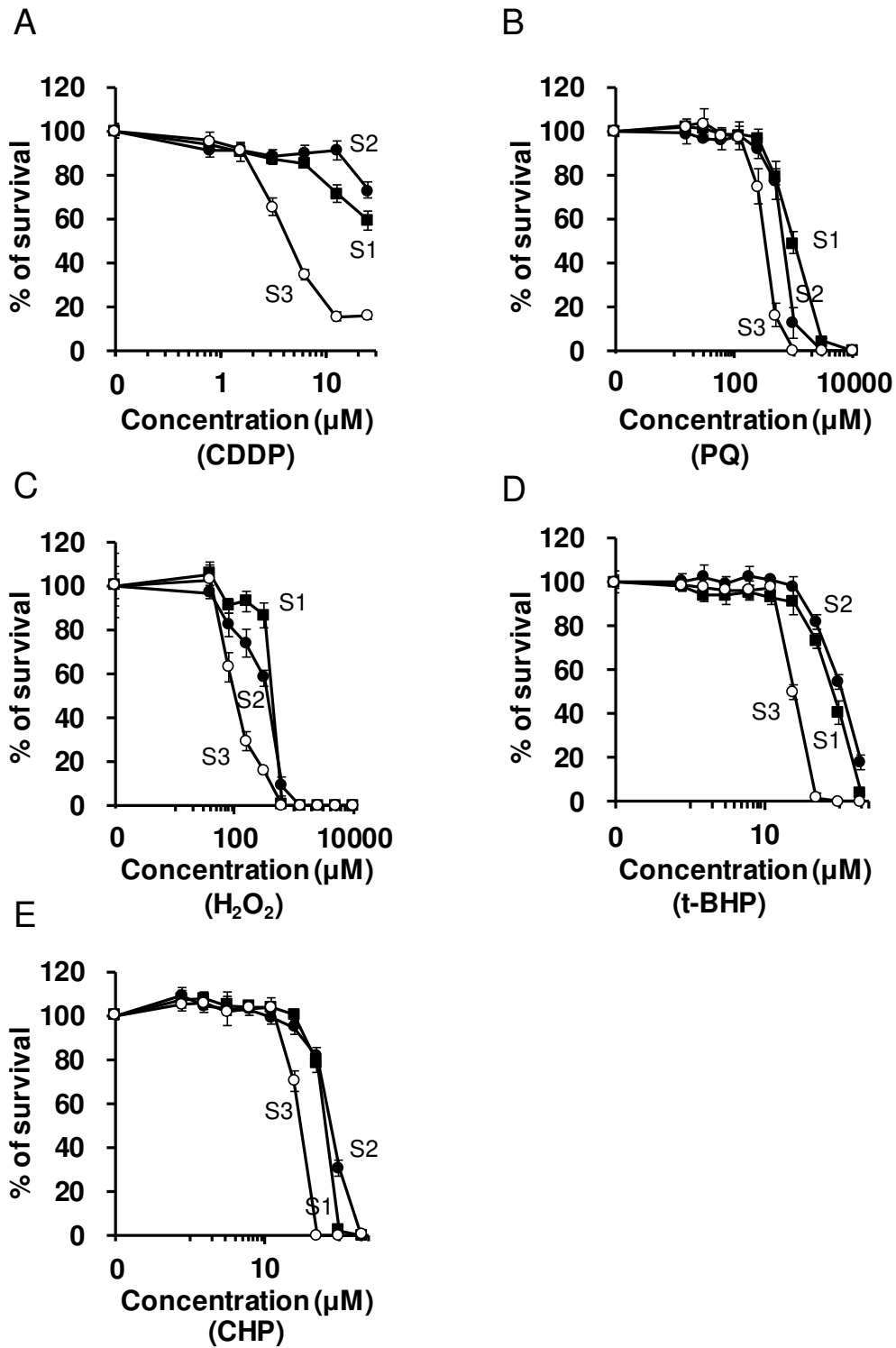


Fig. 2-1. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における ROS 関連物質に対する感受性の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (A) , PQ (B) , H₂O₂ (C) , t-BHP (D) , CHP (E) に 24 時間曝露し、alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。データは、6 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

S1 細胞 (■) 、S2 細胞 (●) 、S3 細胞 (○)

Table. 2-1

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における ROS 関連物質に対する LC₅₀ 値の比較

Reagents (μ M)	Cells		
	S1	S2	S3
CDDP	43.19	72.37	4.544
PQ	6990	9819	3479
H ₂ O ₂	279.2	378.8	109.1
t-BHP	104.9	78.35	24.97
CHP	77.32	59.71	26.14

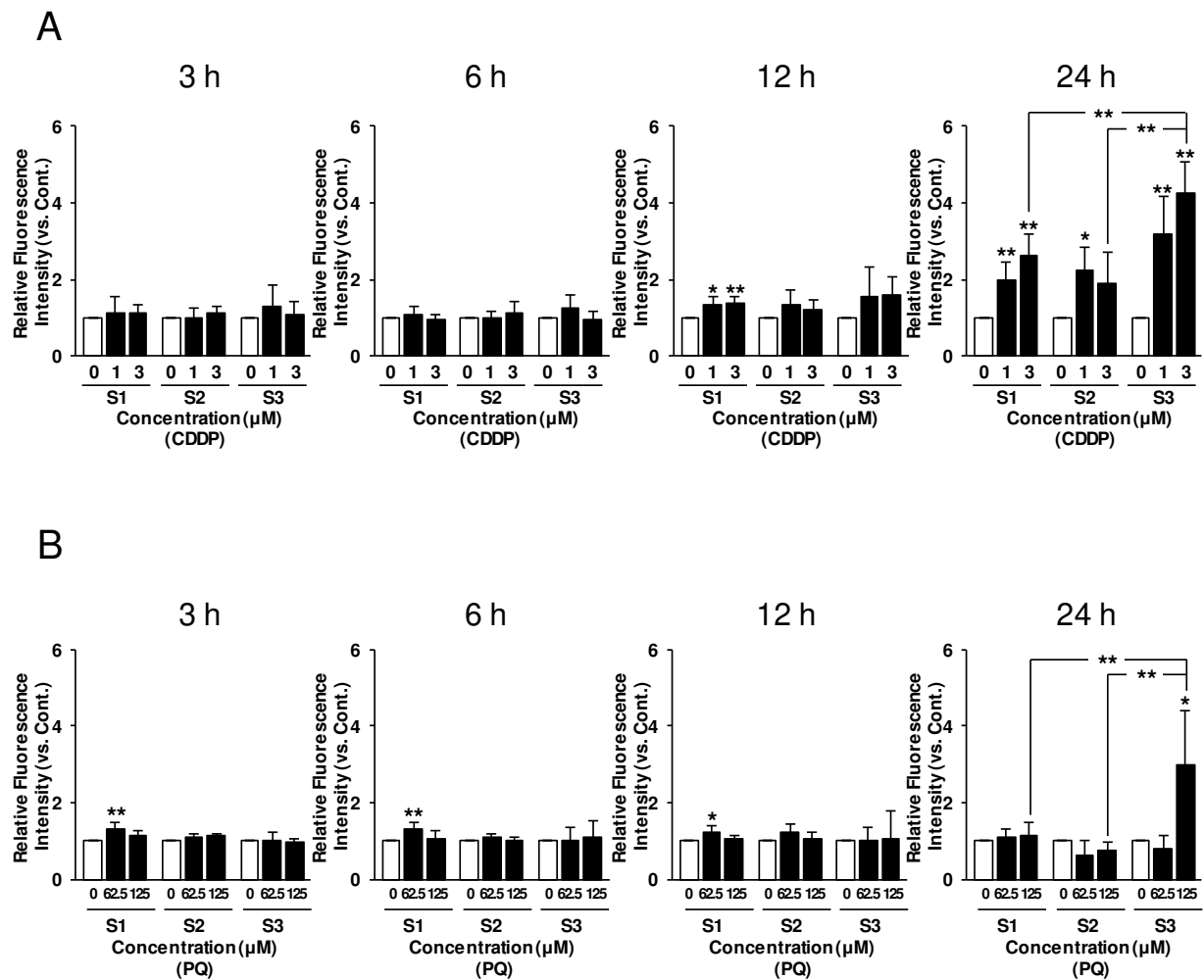


Fig. 2-2. CDDP または PQ 曝露後の細胞内 ROS 量の経時的な測定

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (A) または PQ (B) で 3, 6, 12, 24 時間曝露し、各細胞を DCFH-DA で染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞内 ROS に由来した蛍光強度を測定した。グラフは、各未処理細胞に対する蛍光強度の相対比を示した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$, *Significantly different at $p < 0.05$

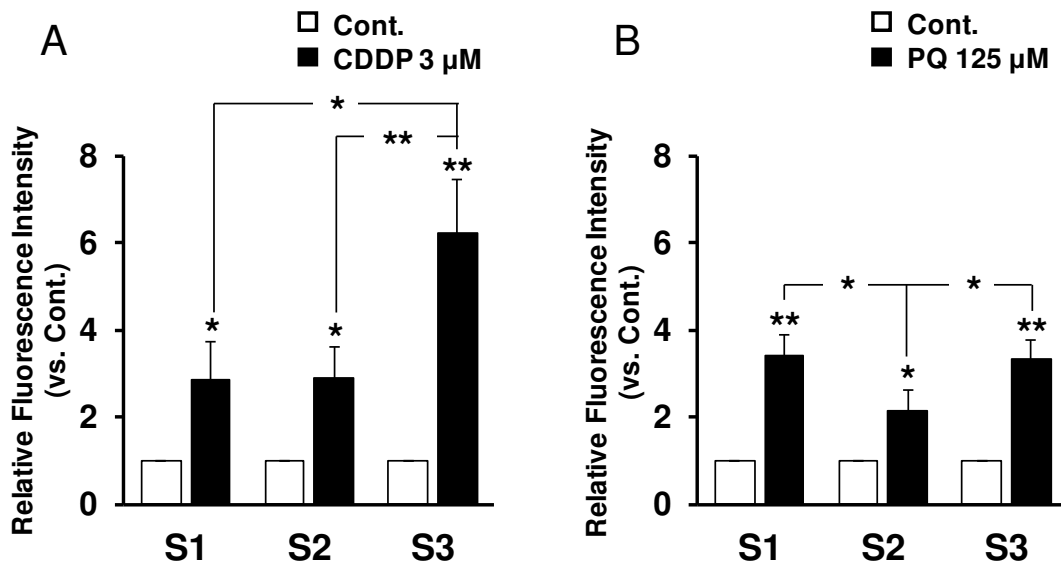


Fig. 2-3. CDDP または PQ 曝露後の細胞内過酸化脂質量の測定

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (3 μM) (A) または PQ (125 μM) (B) を 24 時間曝露し、各細胞を LiperFluo で染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞内過酸化脂質に由来した蛍光強度を測定した。グラフは、各未処理細胞に対する蛍光強度の相対比を示した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$, *Significantly different at $p < 0.05$

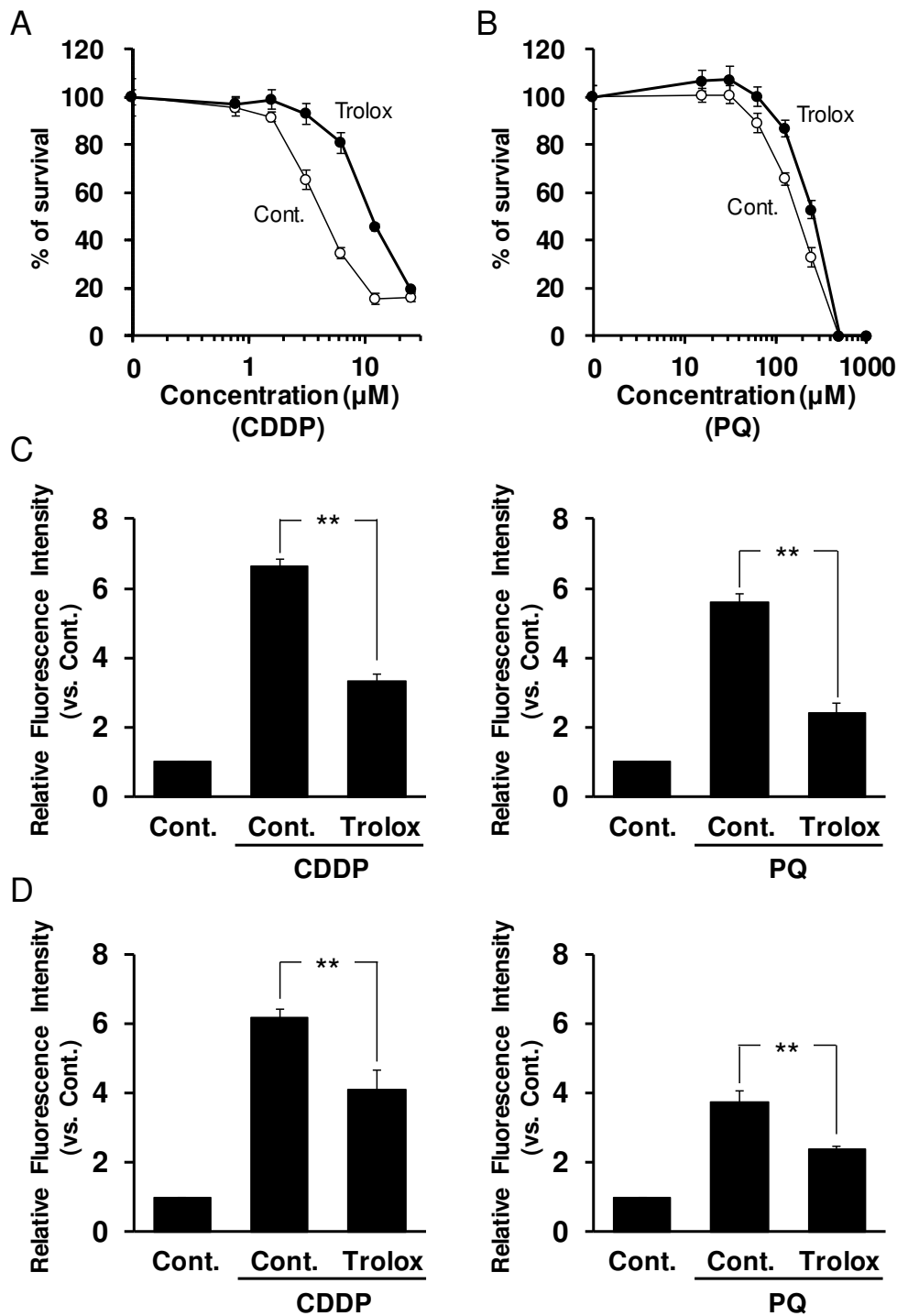


Fig. 2-4. 抗酸化剤 Trolox 処理の効果

A, B. S3 細胞に CDDP (A) または PQ (B) を曝露する際に Trolox (100 μM) を同時添加し、24 時間後に alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。

C, D. S3 細胞に CDDP (3 μM) または PQ (125 μM) を曝露する際に Trolox (100 μM) を同時添加し、24 時間曝露した。その後、細胞内 ROS 量 (C) と細胞内過酸化脂質量 (D) を測定した。グラフは、未処理細胞に対する蛍光強度の相対比を示した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。**Significantly different at $p < 0.01$

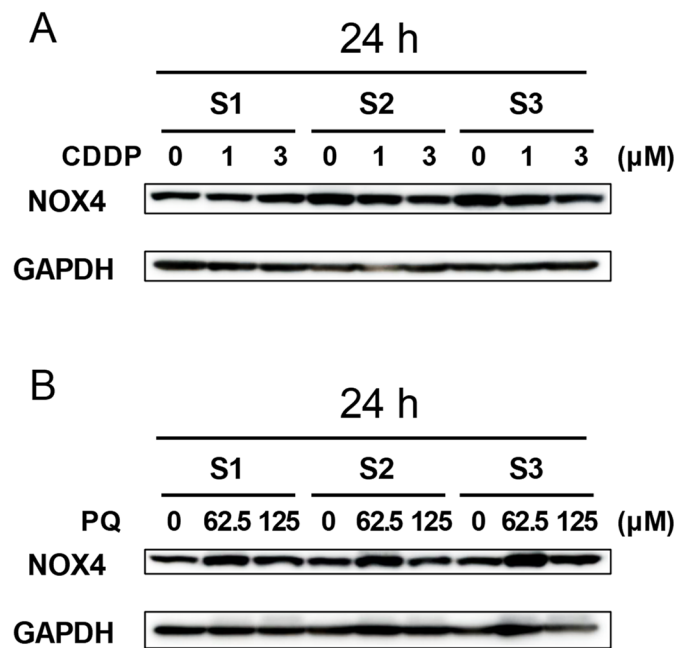


Fig. 2-5. CDDP または PQ 曝露後の NOX4 タンパク質発現量の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (A) または PQ (B) を各濃度で 24 時間曝露した後に、全細胞溶解液を用いて、NOX4 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で測定した。ローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

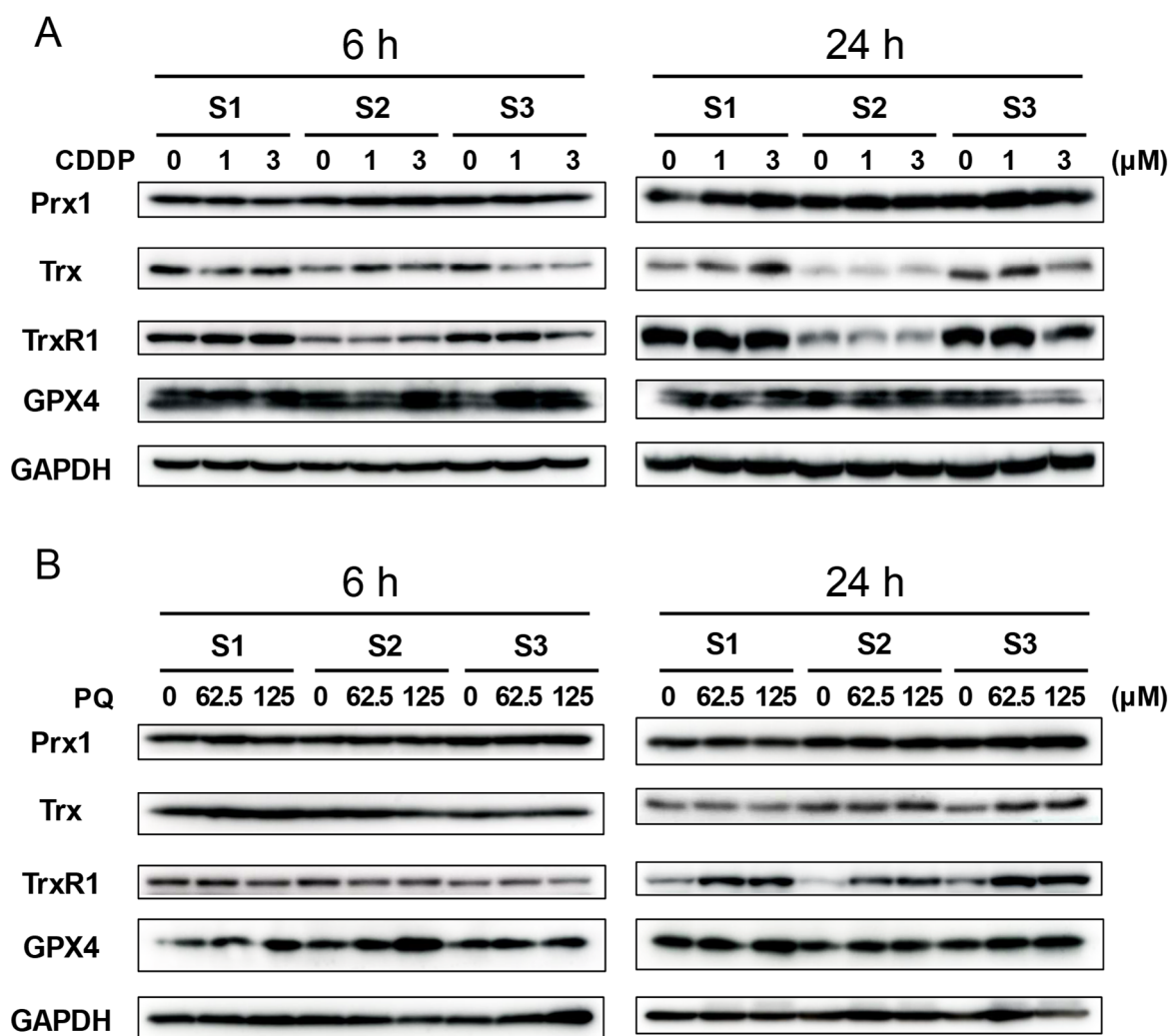


Fig. 2-6. CDDP または PQ 曝露後の抗酸化タンパク質発現量の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (A) または PQ (B) を各濃度で 6, 24 時間曝露した後、全細胞溶解液を用いて、Prx, Trx, TrxR1, GPX4 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で測定した。ローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

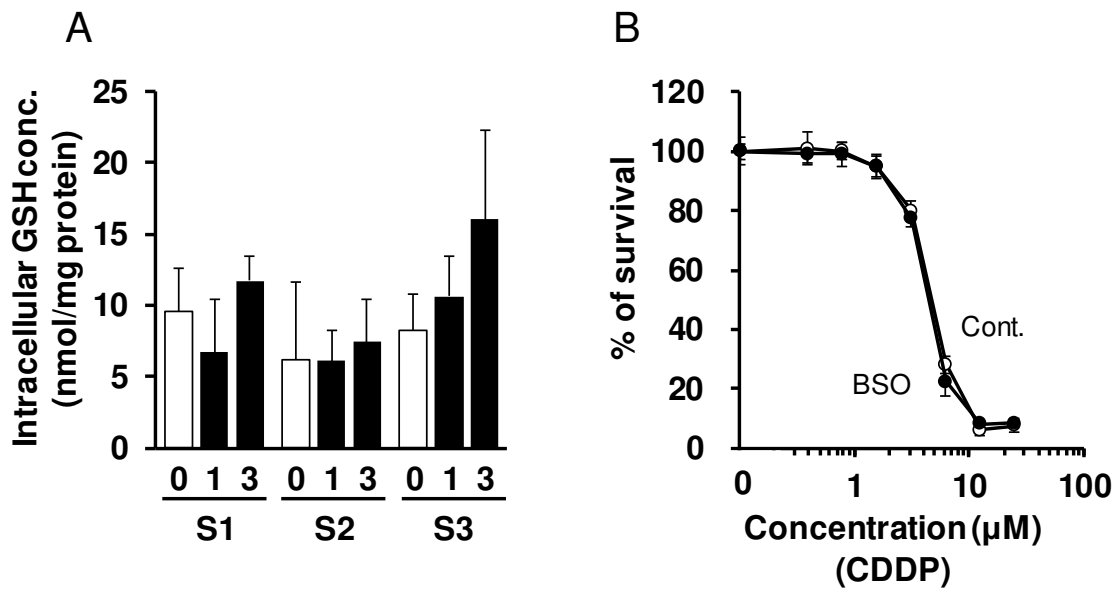


Fig. 2-7. CDDP 曝露後の細胞内 GSH 量と BSO 処理の効果

A. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を曝露し、24 時間後の細胞内 GSH 量を測定した。細胞内 GSH 量は、SBD-F による蛍光標識後、HPLC によって分離させ、蛍光検出器（励起波長 384 nm、蛍光波長 516 nm）で測定した。

B. S3 細胞を BSO (200 μM) で 12 時間前処理し、CDDP に 24 時間曝露した。細胞生存率は、amarBlue を用いた比色法により測定した。Cont (○) , BSO (●) データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

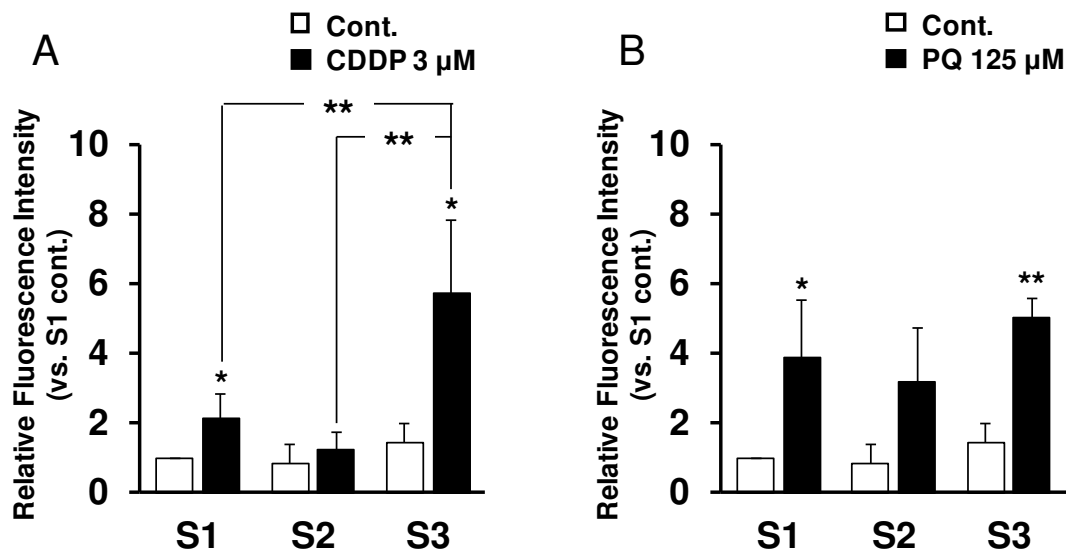


Fig. 2-8. CDDP および PQ 曝露後の細胞内遊離 Fe²⁺量の測定

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (3 μM) (A) または PQ (125 μM) (B) を 24 時間曝露し、FerroOrange で染色後、フローサイトメトリーで細胞内 Fe²⁺の蛍光強度を測定した。

グラフは、各試薬に未処理の S1 細胞に対する蛍光強度を相対比で示した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$, *Significantly different at $p < 0.05$

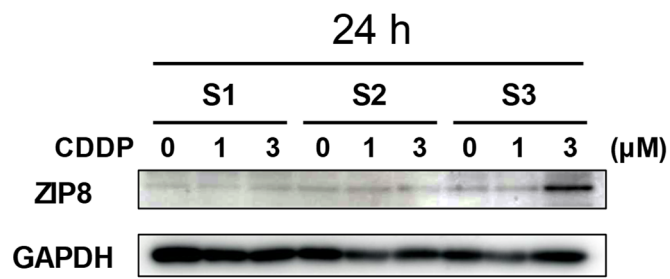


Fig. 2-9. CDDP 曝露後の ZIP8 タンパク質発現量の比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を各濃度で 24 時間曝露した後に、全細胞溶解液を用いて、ZIP8 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で解析した。ローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

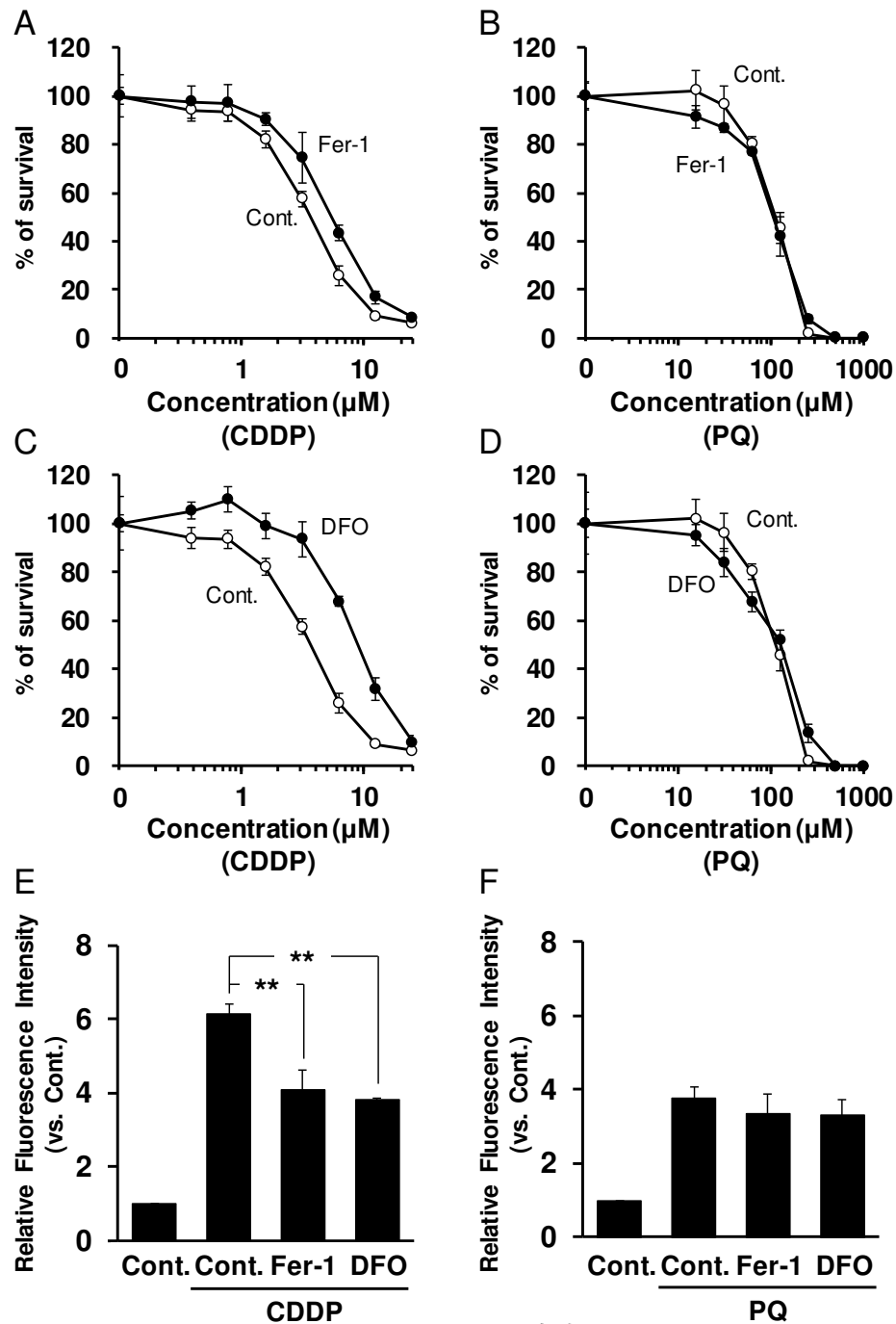


Fig. 2-10. フェロトシス阻害剤処理の効果

A-D. S3 細胞に Fer-1 (30 μM) (A, B) または DFO (100 μM) (C, D) を 2 時間前処理し、CDDP および PQ に曝露し、24 時間後に alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。Cont (○), Fer-1 または DFO (●)

E, F. S3 細胞に Fer-1 (30 μM) または DFO (100 μM) で 2 時間前処理し、CDDP (3 μM) (E) および PQ (125 μM) (F) に曝露し、24 時間後の細胞内過酸化脂質量を測定した。グラフは、未処理細胞に対する蛍光強度の相対比を示した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。**Significantly different at $p < 0.01$

第3章 CDDP 短時間曝露による遅発性腎障害機構の解明

3.1. 目的

CDDP 化学療法において腎障害は、投与後 6～10 日目に発症すること^{121,122}、これらの事象がラットを用いた研究においても再現され、CDDP 投与後 3～5 日目に腎障害を発症することが報告されている^{23,123}。一方、実験動物における CDDP の排泄については、投与後 72 時間以内に尿中に 90%以上が排泄されること²⁹や、Laser ablation ICP-MS を用いた腎臓組織イメージングによって、投与後 4 日目の時点で CDDP の大部分が腎臓から排泄されていることが示されている¹²⁴。これらの研究論文から、CDDP は投与後に腎臓から速やかに排泄されるにもかかわらず、遅発性の腎障害を引き起こすというユニークな特徴を示すことがわかる。しかし、CDDP による遅発性腎障害の発症機構に関する詳細な研究は、行われていない。

本研究では、CDDP による遅発性腎障害の機序を明らかにするために、実験動物および培養細胞株（S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞）を用いて、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞が CDDP による遅発性腎障害の機序解明に有用であるか検証し、CDDP による遅発性腎障害において S3 細胞の高感受性が関与するかについて検討を行った。

3.2. 結果

3.2.1 CDDP を投与したマウスにおける経時的な腎臓組織中 Pt 量の変化

CDDP 投与マウスの腎臓組織中 Pt 蓄積量について経時的な測定を行った。マウスに CDDP (15 mg/kg) を腹腔内に単回投与し、投与 5, 15, 30, 45 分後、1, 6, 12 時間後、1, 2, 4, 7 日後の腎臓組織中 Pt 量を測定した (Fig. 3-1)。その結果、CDDP の投与 15 分後まで腎臓組織中 Pt 量が増加し、30～60 分にかけて減少し、投与 7 日後までほとんど変化しなかった。

3.2.2 CDDP を投与したマウスの腎障害マーカーの経時的な変化

次に、CDDP 投与マウスにおける腎障害マーカーについて経時的に測定を行った。CDDP の投与 1, 2, 4, 7 日後に、腎障害の指標である血中尿素窒素 (BUN) と血清クレアチニン (sCr) を測定した (Fig. 3-2A, B)。その結果、CDDP の投与 4 日後において、BUN と sCr の値は、CDDP 未処理群と比較して増加する傾向がみられた。さらに、BUN や sCr よりも鋭敏な新規腎障害マーカーである *Kim-1* と *clusterin* の腎臓組織中 mRNA 量を経時的に測定した (Fig. 3-2C, D)。*Kim-1* の発現量は、CDDP 投与 4 日後に CDDP 未処理群と比較して 40 倍以上の増加が認められた。*clusterin* の発現量は、CDDP 投与 4 日後に増加する傾向がみられたが、有意な差にはならなかった。

ここまでの結果から、CDDP は投与後速やかに腎臓組織に取り込まれ、排泄されることで、投与 1 時間後から腎臓組織中 Pt 量が低値になっているにも関わらず、投与 4 日後と排泄に遅延した腎障害を発症した。以降の検討では、CDDP による遅発性腎障害の発症機構を、より詳細に分子レベルで明らかにするために、培養細胞株を用いた検討を行った。

3.2.3 S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における経時的な細胞内 Pt 量の変化

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (5 μ M) を 5, 15, 30 分間曝露した際の細胞内 Pt 量を ICP-MS により測定した。その結果、いずれの細胞においても、CDDP 曝露 15 分後に細胞内 Pt 量がピークを示すことが明らかとなった (Fig. 3-3A-C)。また、細胞内 Pt 量のピークである、CDDP 曝露後 15 分において細胞間での細胞内 Pt 量に差はなかった。

3.2.4 S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 短時間曝露後の感受性比較

15 分間の曝露により CDDP が細胞内に取り込まれ、細胞に毒性を与えるかについて検討した。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP に 15 分間曝露し、CDDP を含まない培地に交換し、1, 2, 4 日間培養した際の細胞生存率を測定

した。その結果、いずれの細胞においても培養日数依存的に細胞生存率が低下した (Fig. 3-4 A-C)。S3 細胞は、S1 細胞や S2 細胞と比較して、いずれの培養日数においても CDDP に対して高感受性を示した。培地交換 4 日後の S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の LC₅₀ 値は、S1 : 32.04 μM, S2 : 26.54 μM, S3 : 8.12 μM であり、S3 細胞は S1 細胞や S2 細胞の約 3~4 倍の感受性を有することが示された。また、細胞毒性試験を行った条件と同様に、CDDP の 15 分間曝露後に、培地交換し、1, 2, 4 日間培養した際の細胞内 Pt 量を測定した (Fig. 3-4 D-F)。その結果、培地交換 4 日後の細胞内 Pt 量は、ピークである 15 分後と比較して、すべての細胞において顕著に低い値を示した。これらの結果から、CDDP による遅発性の細胞障害は、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞においても観察され、S3 細胞で最も高い感受性を示すことを見出した。

3.2.5 S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における L-OHP または CBDCA

短時間曝露後の感受性比較

CDDP による遅発性の細胞障害は、培地交換後のすべての培養時間において S3 細胞で高感受性を示した (Fig. 3-4A-C)。この S3 細胞における高感受性が CDDP 特異的な反応であるか、その他の白金系抗がん剤である L-OHP と CBDCA を用いて検討した。S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に L-OHP または CBDCA を 15 分間曝露し、培地交換後 2 日間培養した際の細胞生存率を測定した (Fig. 3-5A, B)。その結果、L-OHP と CBDCA はいずれの細胞においても細胞毒性が検出された。また、細胞毒性を検出するために必要な濃度は、CDDP と比較して高かったが、S3 細胞は S1 細胞や S2 細胞と比較して、高感受性を示した。

3.2.6 CDDP 短時間曝露における S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の細胞周期

CDDP は、DNA の求核部位と架橋を形成することで DNA 障害を引き起こし、その結果、細胞周期の停止と細胞死を誘導する¹²⁵。そこで、CDDP の 15 分間曝露によって引き起こされる細胞毒性に、細胞周期障害が関与しているか検討した。細胞死が起こらない濃度の CDDP (5, 10, 25 μ M) を S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に 15 分間曝露し、CDDP を含まない培地に交換した。その後、細胞を 24 時間培養し、細胞周期測定試薬である Cell Cycle Reagent で染色後、フローサイトメトリーで特定の細胞周期を持った細胞の割合を測定した (Table. 3-1)。その結果、CDDP はいずれの細胞においても G0/G1 期の細胞の割合を減少させ、G2/M 期の細胞の割合を増加させた。また、各細胞周期の変動が、最も大きかった 25 μ M の CDDP を添加した際の G0/G1 期と G2/M 期の細胞の割合における変動は、S3 細胞において大きかった。

3.2.7 CDDP 短時間曝露における S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の

DNA 結合 Pt 量の比較

CDDP による細胞周期障害が S3 細胞において強く検出されたことから、CDDP 添加後の DNA 結合 Pt 量を細胞間で比較した。CDDP (1 mM) を 15 分間曝露した S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞から DNA を抽出し、ICP-MS により Pt 量を測定した (Fig. 3-6A)。その結果、S3 細胞では、DNA 結合 Pt 量が S1 細胞や S2 細胞と比較して高い値を示した。また、CDDP (1 mM) に 15 分間曝露した際の S3 細胞の細胞生存率について測定した (Fig. 3-6B)。その結果、S3 細胞に 1 mM の CDDP を 15 分間曝露しても細胞毒性は、認められなかった。これらの結果から、S3 細胞が遅発性毒性を引き起こし、CDDP に対して高感受性を示す一つの要因として、CDDP-DNA 付加体の形成のしやすさに起因した細胞周期障害が関与していることが示唆された。

3.3. 考察

本章では、CDDP による遅発性腎障害の機序を明らかにするために、実験動物および培養細胞株（S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞）を用いて、以下の検討に取り組んだ。

1. CDDP 投与マウスにおける腎臓組織中 Pt 蓄積量および腎障害マーカーの経時的な測定
2. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 曝露後の細胞内 Pt 量および細胞毒性の経時的な測定
3. CDDP-DNA 付加体形成を介した細胞周期障害の解析

これらの検討から、S3 細胞が遅発性毒性を引き起こし、CDDP に対して高感受性を示す要因の一つとして、CDDP-DNA 付加体の形成のしやすさに起因した、細胞周期障害が関与していることが示唆された。

1. CDDP 投与マウスにおける腎臓組織中 Pt 量および腎障害マーカーの経時的な測定

CDDP 投与マウスにおける腎臓組織中 Pt 量を、投与 5 分から 7 日後まで経時的に測定した (Fig. 3-1)。その結果、腎臓組織中 Pt 量は、投与 15 分後でピークに達し、その後急速に減少した。CDDP の排泄は、投与 1 時間で収束し、投与 7 日後まで腎臓組織中 Pt 量は低いまま一定の値を示した。これまでに、CDDP 投与 1 時間後の腎臓組織中の Pt を測定した研究はいくつかあるが^{124,126}、本研究のように分単位で腎臓組織中 Pt 量を経時的に測定した報告はない。次に、CDDP 投与マウスにおける腎障害の指標を測定した (Fig. 3-2)。BUN は、CDDP 投与 4 日後から増加する傾向が検出された。sCr は、CDDP 投与 1 日後と 4 日後を比較すると増加していた。近年、BUN や sCr よりも *Kim-1* や *clusterin* が特異性・感度の点で優れているため、より鋭敏な腎障害マーカーとして用いられている⁷⁴。本研究では、*Kim-1* mRNA 量が CDDP 未処理群と比較して約 40 倍以上の高い値を示した (Fig. 3-2D)。また、*clusterin*

mRNA 量 (Fig. 3-2C) は、CDDP 投与 4 日後以内に増加する傾向がみられた。本研究の結果は、実験動物に CDDP を投与した研究論文で報告されていた腎障害発症のタイミングと一致していた^{23,123}。以降の研究では、CDDP による遅発性腎障害のメカニズムを解明するために、培養細胞株である S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を用いた *in vitro* 実験に取り組んだ。

2. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 曝露後の細胞内 Pt 量および細胞毒性の経時的な測定

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を曝露した際の細胞内 Pt 量を経時的に測定したところ、CDDP 曝露 15 分後でピークに達した (Fig. 3-3)。近位尿細管における CDDP 輸送に関与するトランスポーターとして、OCT2 や Ctr1 が細胞内取り込みに関与し、MATE1 が排泄に関与している (背景 3)。本研究で得られた 15 分以内で収束する急速な取り込みと排泄には、各輸送体が関与している可能性があり、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞におけるこれらの輸送体の活性について比較・検討する必要がある。

次に、CDDP が 15 分間の曝露においても、細胞毒性を生じさせる可能性があるとして仮説を立てた。細胞に CDDP を 15 分間曝露後、CDDP を含まない培地に交換し、培養したところ、すべての細胞において培養日数の経過とともに、細胞毒性が増加した (Fig. 3-4A-C)。さらに、細胞毒性試験を行った時点における、細胞内 Pt 量を測定したところ、培地交換 4 日後の細胞内 Pt 量は、CDDP 曝露 15 分後のピーク時より、すべての細胞において顕著に低い値を示した (Fig. 3-4D-F)。これらの結果から、S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞においても、CDDP の排泄に遅延した遅発性毒性が検出できることが明らかとなった。また、S3 細胞の高感受性が CDDP 特異的なものであるか調べるため、L-OHP または CBDCA でも同様の検討を行った (Fig. 3-5)。その結果、L-OHP または CBDCA においても、すべての細胞で遅発的な細胞毒性が観察された。さらに、CDDP と同様に S3 細胞は、S1 細胞や S2 細胞と比較して高感受性を示

した。これらの結果は、S3細胞のCDDP遅発性細胞障害における高感受性は、白金系抗がん剤に共通しており、CDDP特異的ではないことを示していた。

3. CDDP-DNA付加体形成を介した細胞周期障害の解析

次に、CDDPによる遅発性腎障害に、CDDP-DNA付加体形成を介した細胞周期障害が関与するのか検討を行った。CDDP-DNA付加体の形成は、DNA構造を歪めることにより、DNA損傷を引き起こす^{127,128}。DNA損傷やその他の異常により細胞周期チェックポイントが活性化され、その結果、細胞周期が停止し、細胞死を誘導する。本章の結果では、S3細胞はS1細胞やS2細胞と比較して、G0/G1期の細胞の割合が減少し、G2/M期の細胞の割合が増加した（Table. 3-1）。また、S3細胞では、S1細胞やS2細胞と比較して、DNA結合Pt量が高い値を示した（Fig. 3-6A）。興味深いことに、細胞内Pt量は、S1細胞、S2細胞、S3細胞間において差が認められなかったことから（Fig. 3-3）、S3細胞はS1細胞やS2細胞と比較して、CDDPがDNAに結合しやすい細胞内環境となっており、CDDP-DNA付加体形成を介した細胞周期障害が生じている可能性が示唆された。

Fig. 3-7の実験において、CDDPの曝露濃度は、1 mMと高濃度で使用した。当初、細胞内Pt量を測定した条件と同様に5 μMのCDDPを使用し、DNA結合Pt量を測定したが、ICP-MSの検出限界以下であった。そのため、CDDP濃度を1 mMに増加させることで、DNA結合Pt量の測定が可能になり、結果としてS3細胞では高い値を示した。また、S3細胞に1 mMのCDDPを15分間曝露した際の細胞生存率について調べたところ、細胞毒性は認められなかった（Fig. 3-6B）。本結果は、高濃度のCDDP曝露による細胞毒性が結果に影響を及ぼしていないことを示した。DNA結合Pt量が5 μMのCDDPで検出できなかった理由の一つとして、CDDP-DNA付加体を切除して除去するヌクレオチド除去修復（NER）の働きが関与している可能性が考えられる。NERは、CDDP-DNA付加体の形成によるDNA損傷を認識することで、異常塩基を除

去し、新たに合成された塩基と置き換えることができる^{129,130}。今後、S1細胞、S2細胞、S3細胞でNER活性に変動があるか、CDDP曝露時のNER活性について比較・検討する必要がある。

本章では、CDDP腎障害のユニークな特徴である遅発性腎障害のメカニズムを検討した。その結果、CDDPによる遅発性細胞障害およびDNA付加体形成を介した細胞周期障害は、S1細胞、S2細胞、S3細胞においても起こり、S3細胞で最も影響が大きかった。今後は、S3細胞においてCDDPがDNAに高濃度で蓄積する原因を解析することで、CDDP腎障害の原因となる因子を特定したい。

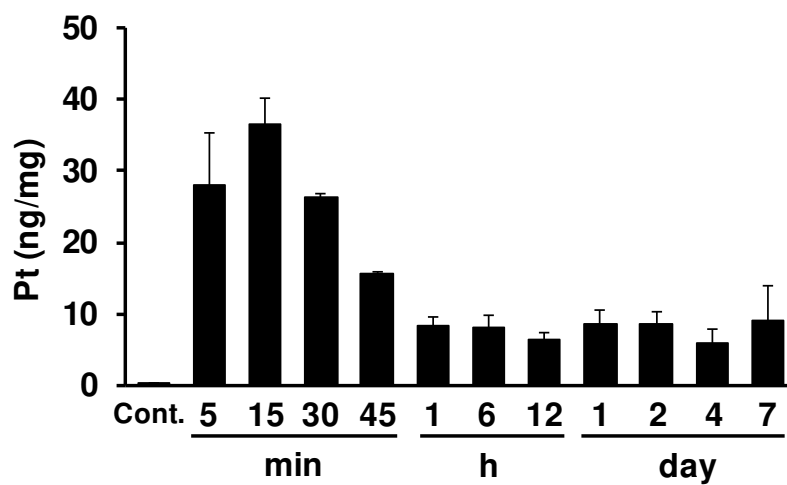


Fig. 3-1. CDDP 投与マウスにおける経時的な腎臓組織中 Pt 量の変化

ICR マウスに CDDP (15 mg/kg) を腹腔内単回投与し、5, 15, 30, 45 分後、1, 6, 12 時間後、1, 2, 4, 7 日後に解剖した。腎臓組織中 Pt 量は、湿式灰化後に ICP-MS により測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

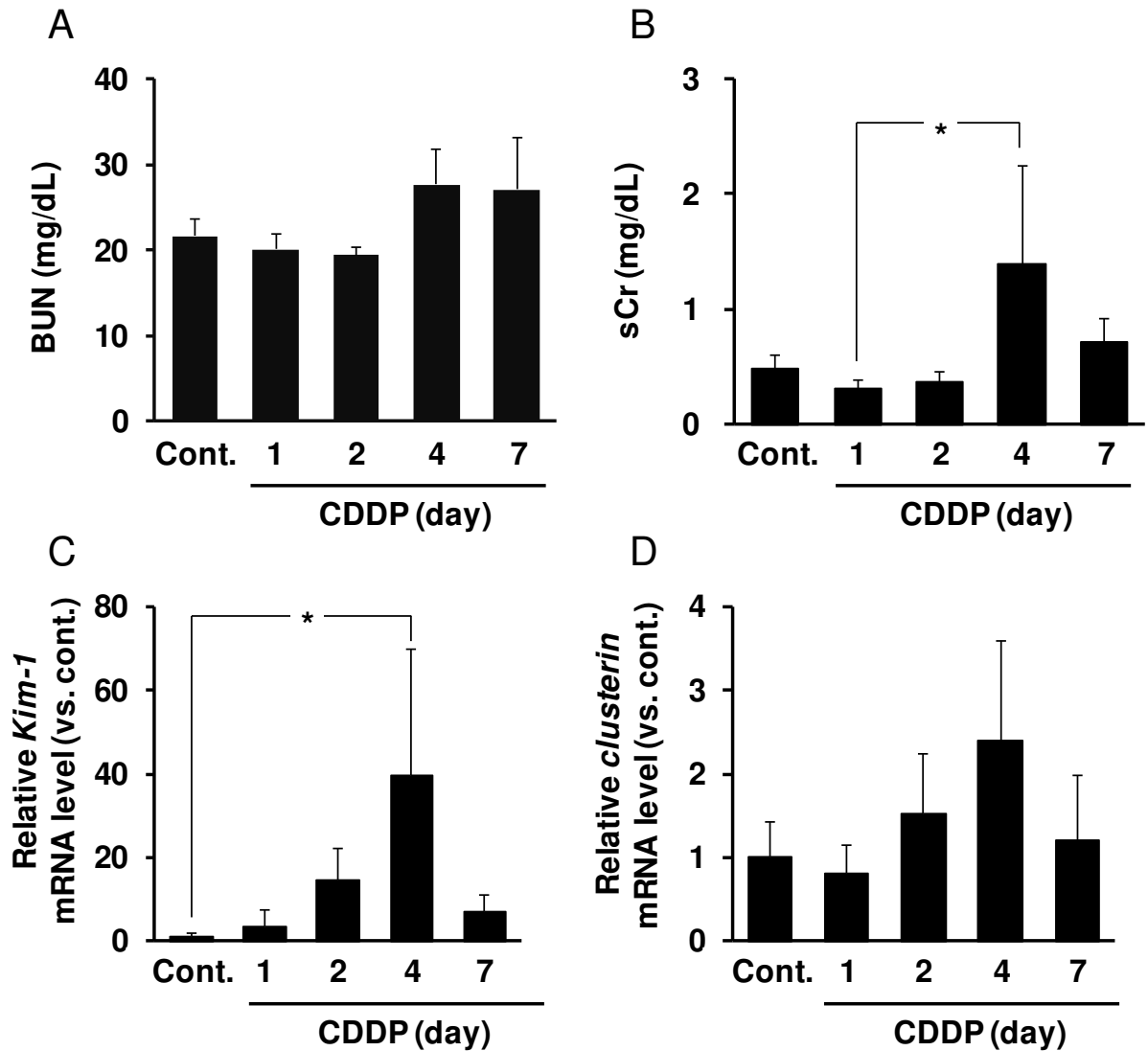


Fig. 3-2. CDDP 投与マウスにおける腎障害マーカーの経時的な変化

ICR マウスに CDDP (15 mg/kg) を腹腔内投与し、1, 2, 4, 7 日後に解剖した。

A, B. 血漿中の BUN (A) および sCr (B) 濃度を測定した。

C, D. *Kim-1* (C) および *clusterin* (D) の腎臓組織中 mRNA を RT-qPCR 法で測定した。

グラフは、未処理群に対する相対比で示す。データは、3 回の独立した実験から得られた平

均値 ± SD を示している。 *Significantly different at $p < 0.05$.

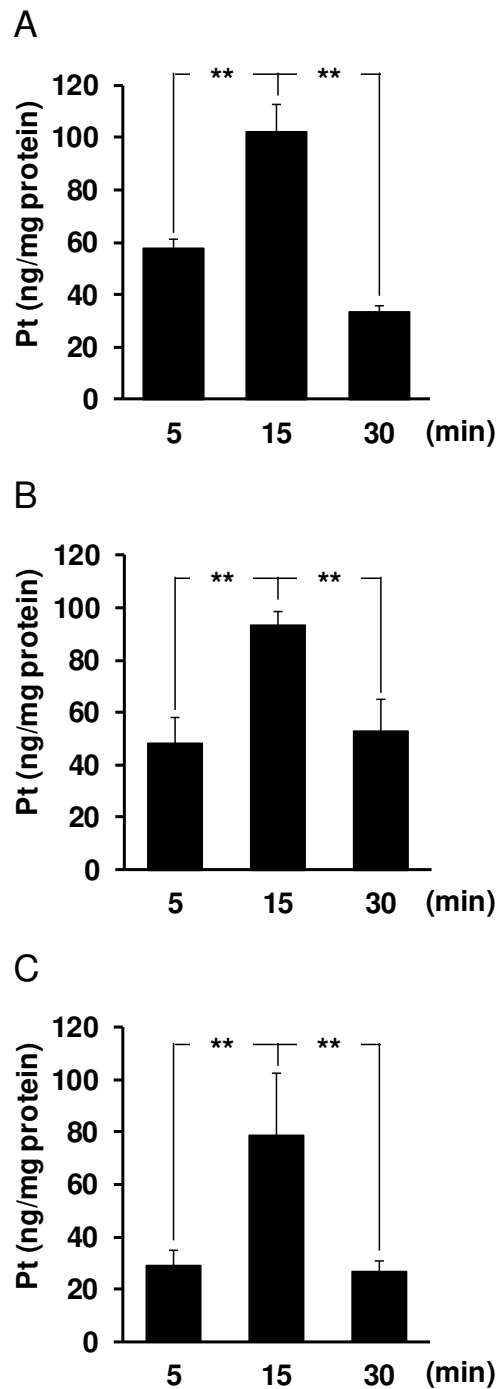


Fig. 3-3. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における経時的な細胞内 Pt 量の変化

S1 細胞 (A)、S2 細胞 (B)、S3 細胞 (C) に CDDP (5 μ M) を 5, 15, 30 分間曝露した。細胞内 Pt 量は、湿式灰化後に ICP-MS で測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 \pm SD を示している。**Significantly different at $p < 0.01$.

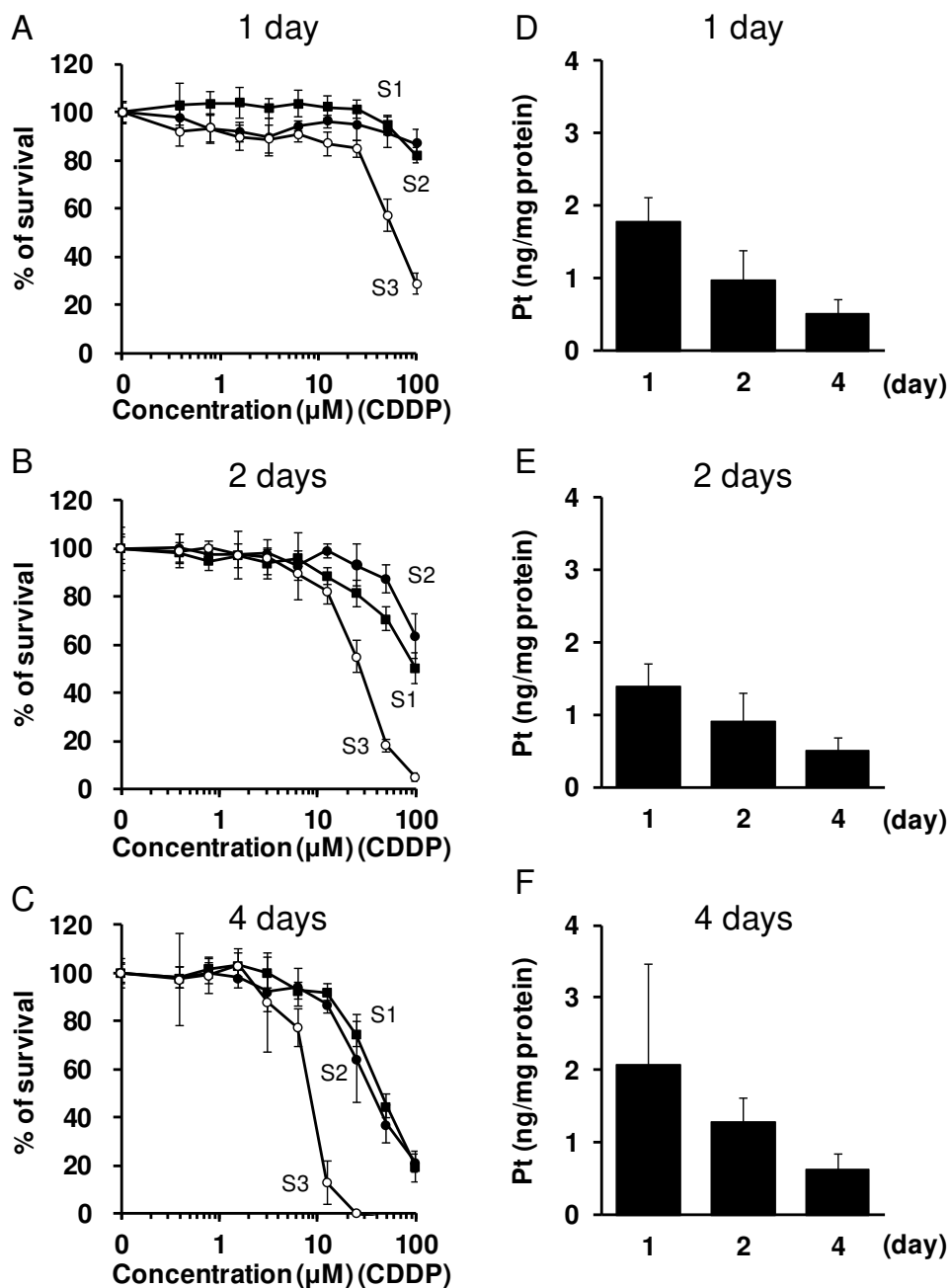


Fig. 3-4. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 短時間曝露後の感受性比較

A-C. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP を 15 分間曝露し、CDDP を含まない培地に交換し、1, (A) , 2 (B) , 4 (C) 日間培養した。細胞生存率は、amarBlue を用いた比色法により測定した。データは、6 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

S1 細胞 (■) 、S2 細胞 (●) 、S3 細胞 (○)

D-F. S1 細胞 (D) 、S2 細胞 (E) 、S3 細胞 (F) に CDDP (5 μM) を 15 分間曝露し、CDDP を含まない培地に交換後、1, 2, 4 日間培養した。細胞内 Pt 量は、湿式灰化後に ICP-MS で測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

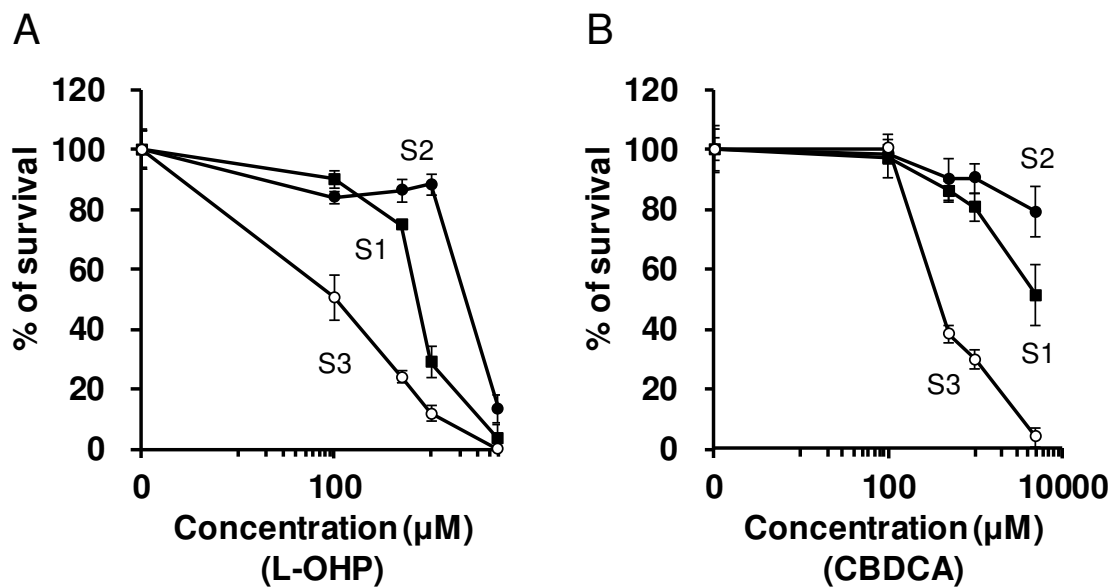


Fig. 3-5. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における L-OHP または CBDCA 短時間曝露後の感受性比較

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に L-OHP (A) または CBDCA (B) を 15 分間曝露し、薬剤を含まない培地に交換し、2 日間培養した。細胞生存率は、amarBlue を用いた比色法により測定した。データは、6 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

S1 細胞 (■)、S2 細胞 (●)、S3 細胞 (○)

Table 3-1.

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞における CDDP 短時間曝露後の細胞周期分布

S1	Cont.		5 μ M		10 μ M		25 μ M	
	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.
G0/G1	45.9	3.04	43.6	2.58	39.9*	1.81	35.8**	0.65
S	13.3	2.26	13.2	2.94	13.0	1.74	12.4	1.70
G2/M	40.8	1.94	43.2	0.74	47.1**	0.79	51.9**	1.74

S2	Cont.		5 μ M		10 μ M		25 μ M	
	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.
G0/G1	46.2	4.44	40.0	4.24	36.3	3.17	26.0**	3.58
S	23.4	1.21	22.6	1.17	22.6	1.86	25.1	4.01
G2/M	30.4	4.59	37.2	4.24	41.0	2.43	48.9**	4.80

S3	Cont.		5 μ M		10 μ M		25 μ M	
	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.
G0/G1	51.2	3.40	45.6	3.11	37.9**	2.57	17.9**	0.75
S	19.6	1.06	19.9	1.76	20.2	1.10	20.9	3.25
G2/M	29.2	2.67	34.4	3.95	41.8*	3.57	61.2**	3.93

S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞に CDDP (5, 10, 25 μ M) を 15 分間曝露後、CDDP を含まない培地に交換し、24 時間培養した。Cell Cycle Reagent で染色後、フローサイトメトリーで特定の細胞周期を持った細胞の割合を測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 \pm SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$ (vs. Control),

*Significantly different at $p < 0.05$ (vs. Control)

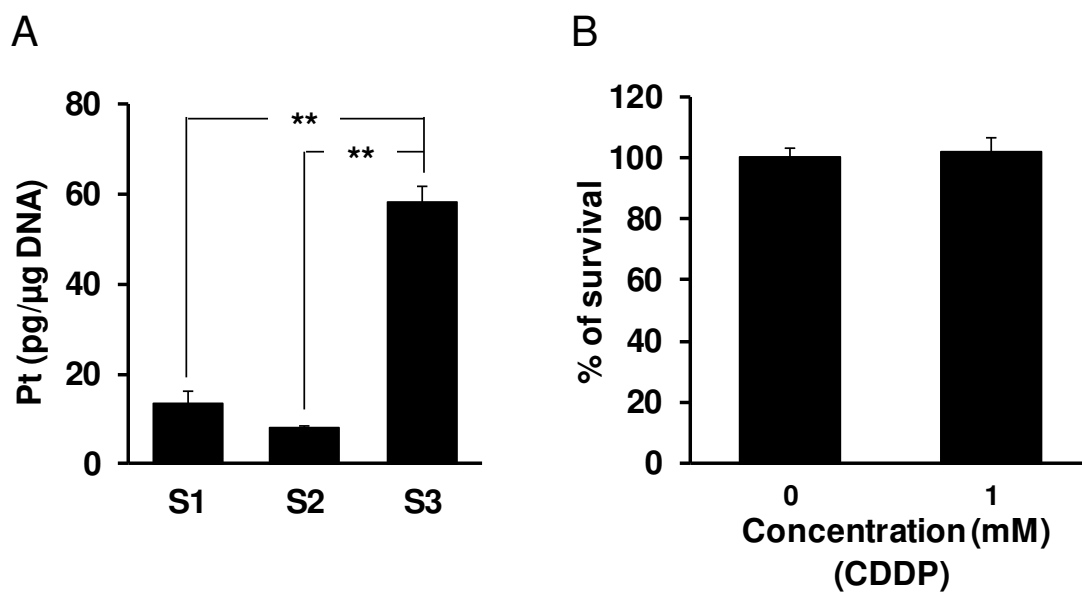


Fig. 3-6. CDDP 短時間曝露における S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞の DNA 結合 Pt 量の比較

A. S1 細胞、S2 細胞、S3 細胞を CDDP (1 mM) に 15 分間曝露した。DNA 結合 Pt 量は、細胞から DNA を抽出し、湿式灰化後、ICP-MS を用いて測定した。

B. S3 細胞を CDDP (1 mM) に 15 分間曝露した。細胞生存率は、alamarBlue による比色法により測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$.

第4章 CDDP 耐性細胞を用いた新規腎障害責任因子の探索

4.1. 目的

CDDP は、広域な固形がんの治療に使用されているが、一部のがん細胞では、化学療法の経過とともに CDDP 耐性を獲得することが報告されている^{131,132,88}。がん細胞による CDDP 耐性の獲得は、治療効果を低下させ、がんの再発や転移、生存率の低下につながる可能性があり、CDDP 化学療法における臨床上的大きな課題である。CDDP 耐性獲得機構として、細胞内 Pt 量の低下¹³³、SH 基を有する GSH やメタロチオネインなどが CDDP と結合することによる CDDP の不活化^{134,135}、アポトーシス経路の抑制¹³⁶などが考えられている。これまでに、培養細胞株に CDDP に対する耐性を獲得させる研究は、行われてきたものの、その多くは治療標的であるがん細胞を使用したものであった。一方、副作用の標的となる腎臓近位尿細管細胞に CDDP 耐性を獲得させる研究は、ほとんど行われていない。本章では、近位尿細管細胞の中でも、特に CDDP に対して高感受性を示す S3 細胞を親株細胞として、CDDP 耐性 (CisR) 細胞を樹立することで、これまで報告されていなかった新規 CDDP 腎障害の責任因子の同定が可能になるのではないかと考え、S3 細胞と CisR 細胞間での性状解析に取り組んだ。

4.2. 結果

4.2.1 CDDP に対する感受性の比較

S3 細胞に CDDP を低濃度 (0.5 μM) で曝露し、生存した細胞を継代した。徐々に CDDP 濃度を上昇させ (1, 3, 5 μM) 継代を繰り返し、最終的には、5 μM の CDDP 存在下で増殖可能な細胞を得た (CisR 細胞)。作製した CisR 細胞が CDDP 耐性を獲得しているか確認するため、CDDP を 24 時間曝露した際の細胞生存率を S3 細胞と比較した (Fig. 4-1)。その結果、CisR 細胞は S3 細胞と比較して、CDDP に対する高い耐性を示した。具体的には、LC₅₀ 値は、

S3 : 2.974 μ M, CisR : 43.89 μ M であり、CisR 細胞は、S3 細胞と比較して約 14 倍の CDDP 耐性を獲得していた。

4.2.2 L-OHP または CBDCA に対する感受性の比較

次に、CisR 細胞がその他の白金系抗がん剤である L-OHP と CBDCA に対して交叉耐性を示すか検討した。L-OHP または CBDCA を 24 時間曝露した際の細胞生存率を S3 細胞と CisR 細胞で比較した (Fig. 4-2)。その結果、L-OHP または CBDCA に対しても、CisR 細胞は S3 細胞と比較して、高い細胞生存率を示したことから、白金系抗がん剤に交叉耐性を示すことが明らかとなった。

4.2.3 ROS 関連物質に対する感受性の比較

第 2 章では、CDDP による S3 細胞の高感受性に ROS が関与していることが明らかとなった。そこで、CisR 細胞の CDDP 耐性獲得に ROS に対する耐性が関与しているのか確認するために、ROS 関連物質である H₂O₂ と PQ に対する感受性を比較した。H₂O₂ または PQ を 24 時間曝露した際の細胞生存率を S3 細胞と CisR 細胞で比較したところ、ROS 関連物質に対する感受性に差はなかった (Fig. 4-3)。

4.2.4 細胞内 GSH 量および GSH 合成酵素の mRNA 発現量の比較

GSH は、細胞内において ROS の消去や薬毒物の代謝、排泄に関与することが知られている¹³⁷。そこで、S3 細胞および CisR 細胞における細胞内 GSH 量 (Fig. 4-4A) と GSH 合成の律速酵素である *glutamylcysteine ligase catalytic submit* (*GCLC*) と *glutamylcysteine ligase modifier submit* (*GCLM*) の mRNA 量 (Fig. 4-4B, C) を比較した。その結果、細胞内 GSH 量 (Fig. 4-4A)、*GCLC*、*GCLM* mRNA 量 (Fig. 4-4B, C) において、S3 細胞と CisR 細胞間での有意な差は検出されなかった。

4.2.5 CDDP 曝露による細胞内 Pt 量および DNA 結合 Pt 量の比較

CisR 細胞における CDDP 耐性獲得機構を明らかにするため、CDDP (5 μ M) を 24 時間曝露した S3 細胞と CisR 細胞における細胞内 Pt 量を比較した (Fig. 4-5 A)。その結果、CisR 細胞は S3 細胞と比較して高い細胞内 Pt 量を示した。

第 3 章において、S3 細胞は S1 細胞や S2 細胞と比較して CDDP 曝露後の DNA 結合 Pt 量が高くなることを示した (Fig. 3-7 A)。そこで、CDDP 曝露による DNA 結合 Pt 量について細胞間で比較した。CDDP (1 mM) を 15 分間曝露した CisR 細胞では、S3 細胞と比較して DNA 結合 Pt 量が低い値を示した (Fig. 4-5 B)。

4.2.6 DNA マイクロアレイによる CDDP 結合タンパク質のスクリーニング

Fig. 4-5 に示すように、CDDP を曝露した CisR 細胞では S3 細胞と比較して、細胞内 Pt 量は高い値を示したが、DNA 結合 Pt 量は低い値を示すという相反する結果が得られた。これらの結果から、CisR 細胞では細胞質中で CDDP と結合するデコイタンパク質が高発現しているのではないかとの仮説を立てた (Fig. 4-6)。そこで、S3 細胞と CisR 細胞の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に解析し、これまでに CDDP と結合することが報告されているタンパク質に着目して、データの抽出を行った結果を表に示す (Table. 4-1)。その結果、セレン (Se) 含有タンパク質であるセレノプロテイン P (SeP) の mRNA 量が CisR 細胞において 10.7 倍増加していた。さらに、SeP タンパク質の発現量は、CisR 細胞において増加しており、マイクロアレイの結果と一致していた (Table. 4-7)。

4.2.7 S3 細胞における *SeP* siRNA 導入による CDDP 毒性の検討

S3 細胞において *SeP* タンパク質の発現量が CDDP 毒性に関与しているのか検討した。S3 細胞を播種する際に、*SeP* siRNA を導入し、24 時間培養した。その後、亜セレン酸 (Na_2SeO_3) (100 nM) を曝露し、24 時間後にタンパク質発現量を測定した (Fig. 4-8 A)。その結果、 Na_2SeO_3 曝露により *SeP* タンパク質発現量は増加したが、この *SeP* タンパク質発現の誘導は、siRNA 導入による *SeP* のノックダウンで抑制された。

次に、同条件下における CDDP 曝露による細胞生存率を測定した (Fig. 4-8 B)。その結果、 Na_2SeO_3 の前処理により、CDDP 毒性が軽減された。さらに、この軽減作用は、siRNA 導入による *SeP* のノックダウンによって阻害された。これらの結果から、S3 細胞における CDDP 毒性に *SeP* タンパク質の発現量が関与していることが示唆された。

4.3. 考察

本章では、S3 細胞に CDDP に対する耐性を獲得させた CisR 細胞の性状解析を行うことで、CDDP 腎障害における新規責任因子の同定を目指し、以下の検討に取り組んだ。

1. 白金系抗がん剤に対する感受性の比較
2. 細胞内 GSH 量および ROS 関連物質に対する感受性の比較
3. 細胞内 Pt 量および DNA 結合 Pt 量の比較
4. CDDP 毒性における SeP タンパク質発現量の影響

これらの検討から、CisR 細胞では、SeP タンパク質の発現量が増加しており、SeP タンパク質の発現量増加が CDDP による細胞毒性を抑制することを明らかにした。

1. 白金系抗がん剤に対する感受性の比較

始めに、作製した CisR 細胞が CDDP に耐性を獲得しているのか確認するため、細胞間で感受性を比較した (Fig. 4-1)。その結果、CisR 細胞は S3 細胞と比較して約 14 倍の耐性を獲得していた。さらに、CisR 細胞は CDDP 以外の白金系抗がん剤 (L-OHP, CBDCA) に対しても交叉耐性を示した (Fig. 4-2)。このことから、CisR 細胞における CDDP に対する耐性機構は、白金系抗がん剤に共通した毒性防御機構である可能性が示唆された。以降の検討では、親株である S3 細胞と CisR 細胞間での性状解析を行った。

2. 細胞内 GSH 量および ROS 関連物質に対する感受性の比較

これまでに、がん細胞における CDDP に対する耐性獲得機構として、細胞内 GSH 量の増加が報告されている^{138,139}。細胞内 GSH の増加は、酸化ストレスの防御や CDDP の代謝、排泄を亢進することにより CDDP に対する耐性化に寄与する¹³⁷。本章の結果から、細胞内 GSH 量、GSH 合成酵素である *GCLC*、*GCLM* の mRNA 発現量において細胞間で差はなかった (Fig. 4-4)。また、

ROS 関連物質である H₂O₂ や PQ に対して細胞間で感受性に差はなかった (Fig. 4-3)。これらの結果から、CisR 細胞における CDDP 耐性化の獲得には、抗酸化システムの増強ではない、その他の要因が関与していることが示唆された。

3. 細胞内 Pt 量および DNA 結合 Pt 量の比較

通常、薬毒物に耐性を獲得させる研究では、細胞内取り込み量の減少や排泄の亢進といった薬毒物の細胞内蓄積量を減少させる変化が生じることで、耐性を獲得する報告が多数存在する^{134,140-142}。本研究の結果から、CDDP を曝露した CisR 細胞では、S3 細胞と比較して高い細胞内 Pt 量を示した (Fig. 4-5 A)。一方、DNA 結合 Pt 量は、細胞内 Pt 量に反し、CisR 細胞において低い値を示した (Fig. 4-5 B)。この矛盾に対して、生体内で薬毒物と結合・捕捉することにより無毒化するデコイタンパク質 (メタロチオネインなど) の存在に着目し¹⁴³⁻¹⁴⁷、「CisR 細胞では、細胞質中に CDDP を捕捉するデコイタンパク質が高発現しており、毒性が低下した」と仮説を立てた (Fig. 4-6)。

4. CDDP 毒性における SeP タンパク質発現量の影響

これまでに、CDDP と結合することが報告されていたタンパク質に着目し、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現量の解析結果から、Se 含有タンパク質である *SeP* の発現量が CisR 細胞において 10.7 倍増加していることを発見した (Table. 4-1)。*SeP* は、セレノシステイン (Sec: システイン (Cys) の硫黄が Se に置き換わったアミノ酸) を複数含有する非常にユニークな一次構造を有する血漿中タンパク質である¹⁴⁸。構造の中央部分には連続したヒスチジン (His) および塩基性アミノ酸に富む領域 (His-rich domain) が存在し、CDDP が *SeP* の His-rich domain に結合することが報告されている¹⁴⁷。しかしながら、CDDP 腎障害における *SeP* の関与については明らかになっていない。

SeP タンパク質の発現量が CDDP による細胞毒性に与える影響について検討するため、siRNA によるノックダウンを試みた。当初、CisR 細胞に *SeP*

siRNA の導入を行ったが、mRNA 量およびタンパク質発現量が減少しなかったため、親株である S3 細胞を用いた。SeP タンパク質の発現は、 Na_2SeO_3 などの Se 源の供給によって誘導されることが知られている¹⁴⁹。そこで、S3 細胞への Na_2SeO_3 (100 nM) の曝露により SeP タンパク質の発現量が増加するか、SeP ノックダウンにより Na_2SeO_3 によるタンパク質発現量の増加が抑制されるかについて検討した (Fig. 4-8)。その結果、S3 細胞に Na_2SeO_3 を曝露することにより、SeP タンパク質の発現量が増加し、CDDP 毒性が軽減した。また、SeP のノックダウンにより Na_2SeO_3 による SeP タンパク質発現誘導の効果が阻害され、CDDP 細胞毒性の抑制効果が低下した。この結果から、CDDP 腎障害の防御因子として SeP が関与していることが示唆された。

本来、SeP は肝臓での発現量が高く、血漿中に分泌されることで Se を各臓器へ輸送する役割を持つ¹⁴⁸。これまでに、近位尿細管における解毒応答として SeP タンパク質が発現誘導されることは新たな知見であり、今後更なる検討を行うことで近位尿細管における SeP の新規役割の解明に繋げたい。

本章では、S3 細胞に CDDP 耐性を獲得させた CisR 細胞の性状解析を行い、CDDP 腎障害における新規責任因子の同定を目指した。CisR 細胞では、SeP タンパク質の発現量が増加しており、SeP タンパク質の発現量の増加が CDDP による細胞毒性を抑制したことから、CDDP 腎障害における新規防御因子である可能性が示唆された。今後は、CDDP 腎障害に対する新規治療標的として SeP の確立を目指すため、SeP による CDDP 腎障害の防御機構について詳細な検討を行う。

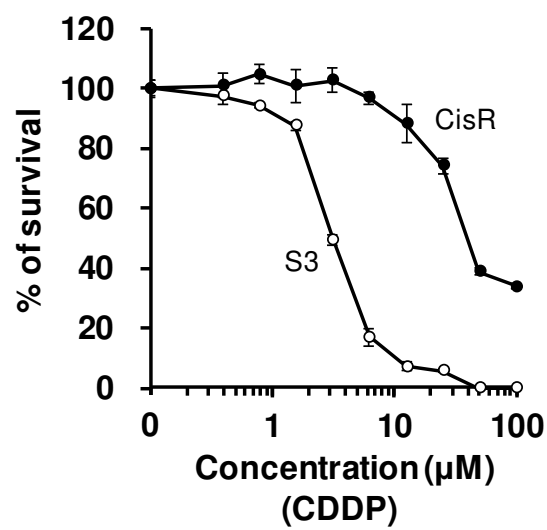


Fig. 4-1. CDDP に対する感受性の比較

S3 細胞および CisR 細胞を CDDP で 24 時間曝露し、alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。データは、6 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

S3 細胞 (○)、CisR 細胞 (●)

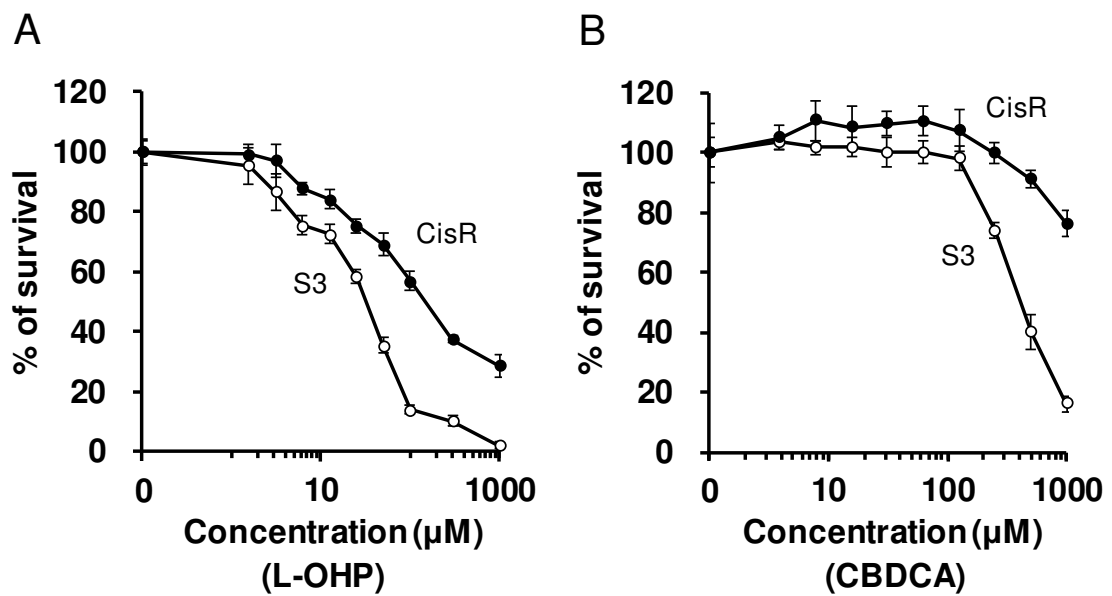


Fig. 4-2. L-OHP または CBDCA に対する感受性の比較

S3 細胞および CisR 細胞を L-OHP (A) または CBDCA (B) で 24 時間曝露し、alamarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

S3 細胞 (○)、CisR 細胞 (●)

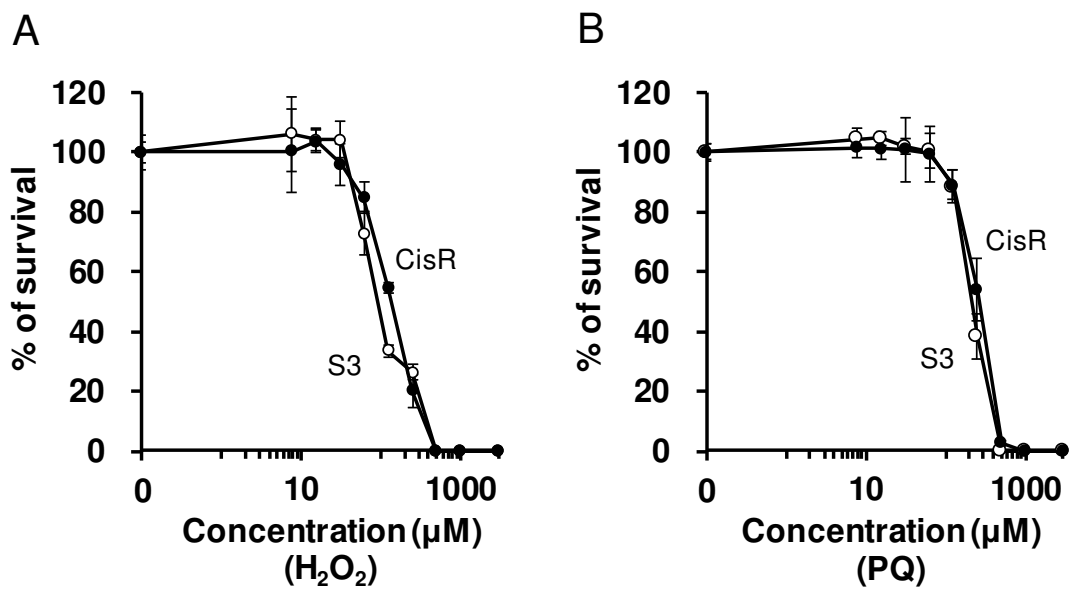


Fig. 4-3. H₂O₂またはPQに対する感受性の比較

S3 細胞および CisR 細胞を H₂O₂ (A) または PQ (B) で 24 時間曝露し、amarBlue を用いた比色法により細胞生存率を測定した。データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ±SD を示している。

S3 細胞 (○)、CisR 細胞 (●)

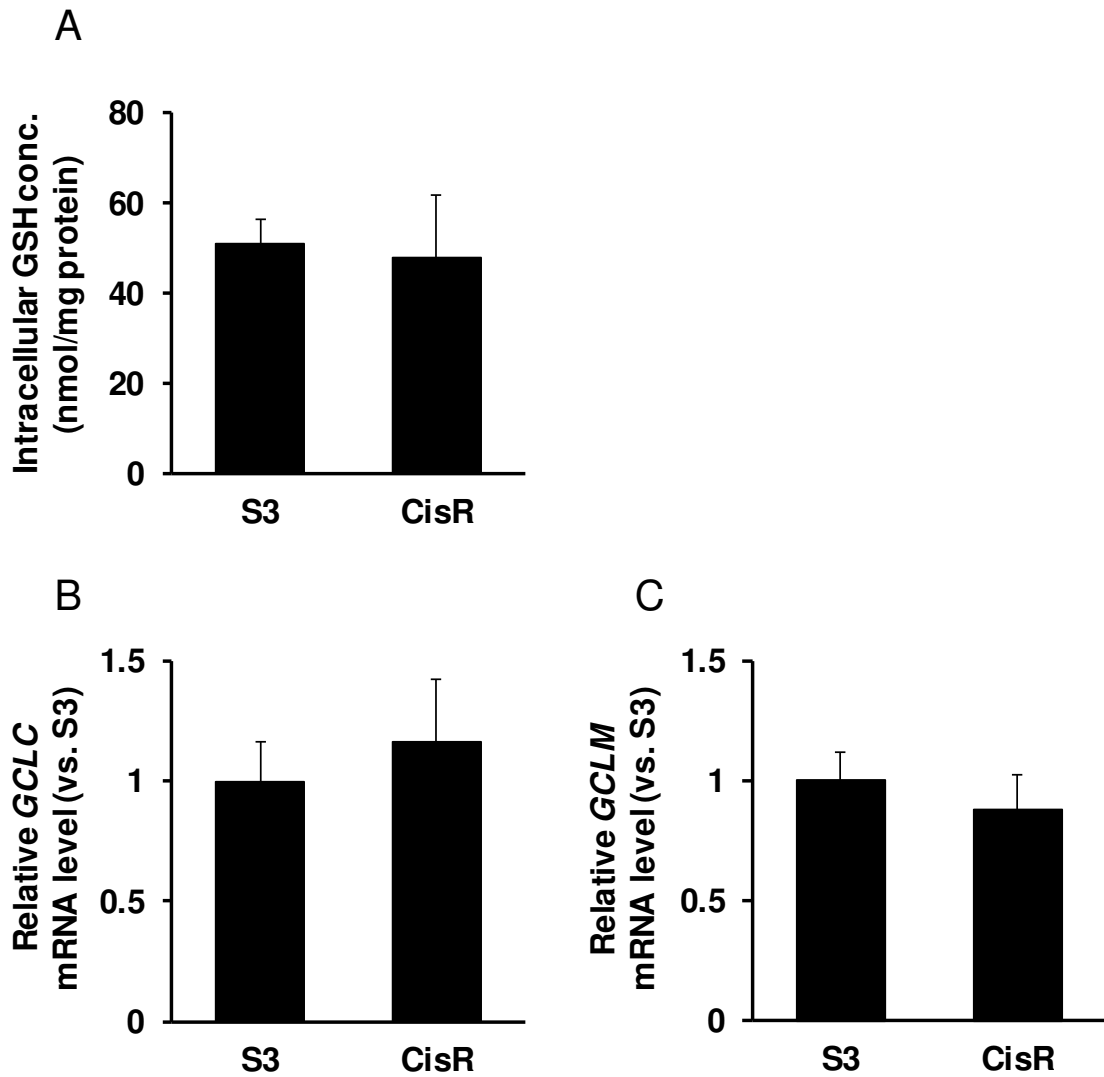


Fig. 4-4. 細胞内 GSH 量および GSH 合成関連酵素の mRNA 発現量の比較

A. S3 細胞および CisR 細胞における細胞内 GSH 量を測定した。細胞内 GSH 量は、SBD-F による蛍光標識後、HPLC によって分離させ、蛍光検出器（励起波長 384 nm、蛍光波長 516 nm）で測定した。

B. S3 細胞および CisR 細胞における *GCLC*, *GCLM* の mRNA 発現量を RT-qPCR 法で測定した。

データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

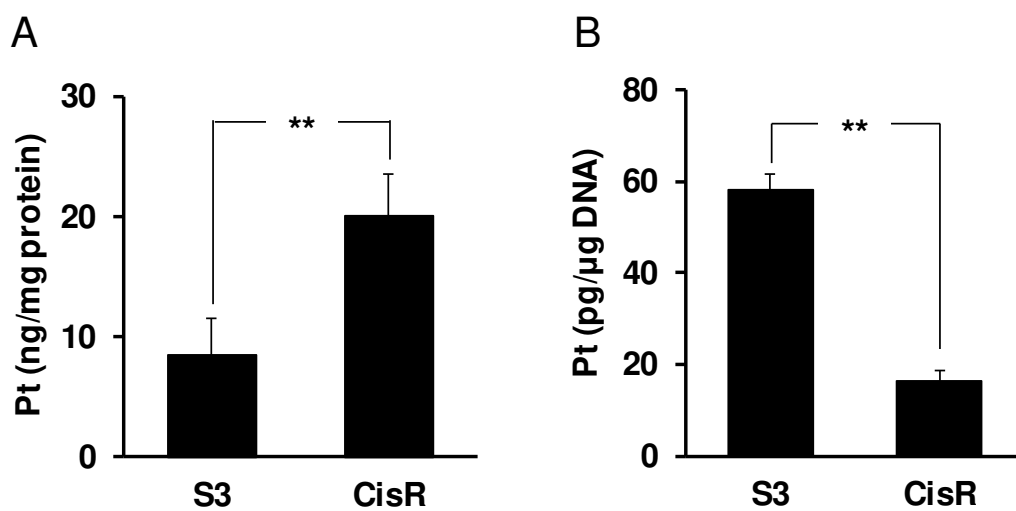


Fig. 4-5. CDDP 曝露による細胞内 Pt 量および DNA 結合 Pt 量の比較

A. S3 細胞および CisR 細胞に CDDP (0.5 μ M) を 24 時間曝露した。細胞内 Pt 量は、湿式灰化後に ICP-MS を用いて測定した。

B. S3 細胞および CisR 細胞に CDDP (1 mM) を 15 分間曝露した。DNA 結合 Pt 量は、細胞から DNA を抽出し、湿式灰化後、ICP-MS を用いて測定した。

データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 \pm SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$

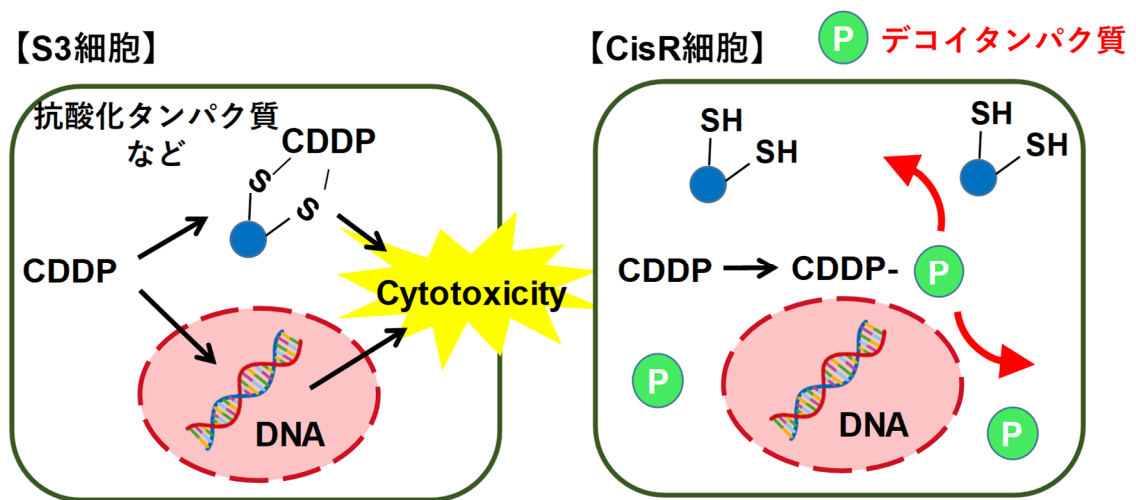


Fig. 4-6. CisR 細胞における CDDP 耐性の獲得機構 (仮説)

S3 細胞において細胞内に取り込まれた CDDP は、細胞質中の抗酸化タンパク質や核内の DNA と結合することによって、細胞死を誘導する。一方、CisR 細胞は、細胞内にシスプラチンを捕捉することで不活化させる囷となるタンパク質 (デコイタンパク質) が高発現しており、細胞毒性を軽減しているのではないかと仮説を立てた。

Table. 4-1**DNA マイクロアレイによる CDDP 結合タンパク質のスクリーニング**

Cisplatin binding proteins	CisR/S3
Definition	
<i>Selenoprotein P</i>	10.7
<i>protein disulfide isomerase associated 6</i>	1.54
<i>heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1</i>	1.53
<i>metallothionein 1</i>	1.40
<i>glutathione S-transferase, pi 2</i>	1.37
<i>calreticulin</i>	1.22
<i>heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1</i>	1.15
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i>	1.14
<i>valosin containing protein</i>	1.03
<i>glutathione S-transferase, pi 1</i>	1.00
<i>heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1</i>	0.97
<i>growth factor receptor bound protein 2-associated protein 2</i>	0.93
<i>COP9 signalosome subunit 4</i>	0.75
<i>protein disulfide isomerase associated 3</i>	0.73
<i>ribosomal protein L5</i>	0.67
<i>metallothionein 2</i>	0.50

S3 細胞および CisR 細胞での遺伝子発現変化について DNA マイクロアレイで検討した。表は、これまでに CDDP と生体内および試験管内で結合することが報告されていたタンパク質に着目し、データの抽出を行ったものを示す (n=1)。

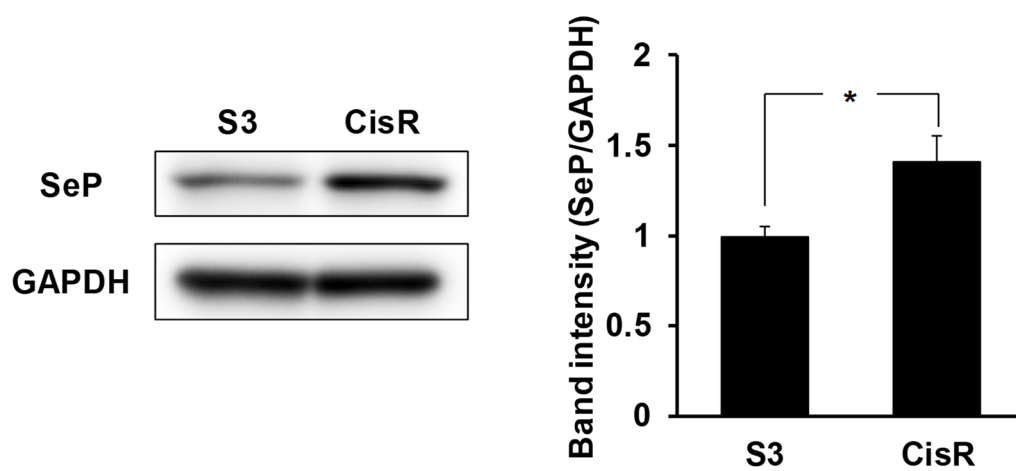


Fig. 4-7. S3 細胞および CisR 細胞における SeP タンパク質発現量の比較

S3 細胞および CisR 細胞の全細胞溶解液を用いて、SeP のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で測定した。ローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

データは、3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を示している。

*Significantly different at $p < 0.05$

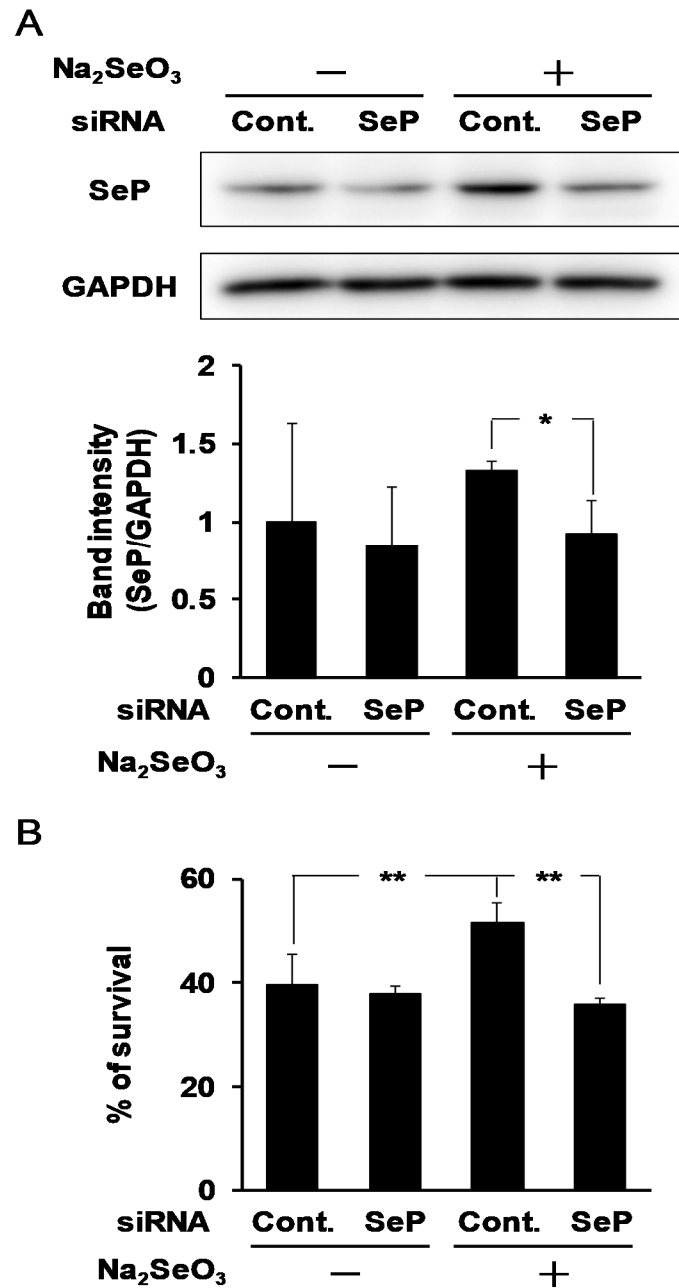


Fig. 4-8. S3 細胞における SeP ノックダウンによる CDDP 毒性の変化

A. S3 細胞に siRNA を導入後、Na₂SeO₃ (100 nM) を 24 時間曝露し、SeP タンパク質の発現量をウエスタンブロット法で測定した。

B. S3 細胞に siRNA を導入後、Na₂SeO₃ (100 nM) を 24 時間曝露し、CDDP (5 μM) を 24 時間曝露した。細胞生存率は、amarBlue を用いた比色法で測定した。

データは、3 回の独立した実験から得られた平均値 ± SD を示している。

**Significantly different at $p < 0.01$, *Significantly different at $p < 0.05$

引用文献

1. Kauffman, G. *et al.* Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Review* **54**, 250–256 (2010).
2. Rosenberg, B. *et al.* Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698–699 (1965).
3. Rosenberg, B. & VanCamp, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Research* **30**, 1799–1802 (1970).
4. Cvitkovic, E. *et al.* Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer* **39**, 1357–1361 (1977).
5. Wiltshaw, E. Cisplatin in the Treatment of Cancer. *Platinum Metals Review* **23**, 90–98 (1979).
6. Filewod, N. & Lipman, M. L. Severe acute tubular necrosis observed subsequent to oxaliplatin administration. *Clinical Kidney Journal* **7**, 68–70 (2014).
7. Lyrio, R. M. da C. *et al.* Chemotherapy-induced acute kidney injury: epidemiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Frontiers in Nephrology* **4**, (2024).
8. Hanna, N. & Einhorn, L. H. Testicular Cancer: A Reflection on 50 Years of Discovery. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 3085–3092 (2014).
9. Peng, H. *et al.* Enhanced antitumor efficacy of cisplatin for treating ovarian cancer in vitro and in vivo via transferrin binding. *Oncotarget* **8**, 45597–45611 (2017).
10. Cheng, Y. *et al.* Targeting CXCR2 inhibits the progression of lung cancer and promotes therapeutic effect of cisplatin. *Molecular Cancer* **20**, 62 (2021).
11. de Vries, G. *et al.* Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. *Cancer Treatment Reviews* **88**, 102054 (2020).
12. Basu, A. & Krishnamurthy, S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA

- Damage. *Journal of Nucleic Acids* **2010**, e201367 (2010).
13. Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 307–320 (2005).
 14. Latcha, S. *et al.* Long–Term Renal Outcomes after Cisplatin Treatment. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1173 (2016).
 15. Szeffler, B. & Czeleń, P. Will the Interactions of Some Platinum (II)-Based Drugs with B-Vitamins Reduce Their Therapeutic Effect in Cancer Patients? Comparison of Chemotherapeutic Agents such as Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin—A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 1548 (2023).
 16. Oh, G.-S. *et al.* Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press* **12**, 55–65 (2014).
 17. McSweeney, K. R. *et al.* Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations. *Cancers* **13**, 1572 (2021).
 18. Cole, W. C. & Wolf, W. Preparation and metabolism of a cisplatin/serum protein complex. *Chemico-Biological Interactions* **30**, 223–235 (1980).
 19. Okada, A. *et al.* Alterations in Cisplatin Pharmacokinetics and Its Acute/Sub-chronic Kidney Injury over Multiple Cycles of Cisplatin Treatment in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **40**, 1948–1955 (2017).
 20. Perše, M. & Večerić-Haler, Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *BioMed Research International* **2018**, 1462802 (2018).
 21. Litterst, C. *et al.* Distribution and Disposition of Platinum following Intravenous Administration of cis-Diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to Dogs. *Cancer Research* **36**, 2340–2344 (1976).
 22. Zhang, J. *et al.* Cisplatin chemotherapy and renal function. *Advances in Cancer Research* **152**, 305–327 (2021).

23. Dobyán, D. C. *et al.* Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **213**, 551–556 (1980).
24. Wright, S. H. Molecular and cellular physiology of organic cation transporter 2. *Am J Physiol Renal Physiol* **317**, F1669–F1679 (2019).
25. Neuhoff, S. *et al.* pH-Dependent Bidirectional Transport of Weakly Basic Drugs Across Caco-2 Monolayers: Implications for Drug–Drug Interactions. *Pharm Res* **20**, 1141–1148 (2003).
26. Lepist, E.-I. & Ray, A. S. Renal drug–drug interactions: what we have learned and where we are going. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **8**, 433–448 (2012).
27. George, B. *et al.* Xenobiotic transporters and kidney injury. *Advanced Drug Delivery Reviews* **116**, 73–91 (2017).
28. Ciarimboli, G. Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Side-effects. *Anticancer Research* **34**, 547–550 (2014).
29. Filipski, K. *et al.* Contribution of Organic Cation Transporter 2 (OCT2) to Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **86**, 396–402 (2009).
30. Katsuda, H. *et al.* Protecting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity with Cimetidine Does Not Affect Antitumor Activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **33**, 1867–1871 (2010).
31. Iwata, K. *et al.* Effects of genetic variants in SLC22A2 organic cation transporter 2 and SLC47A1 multidrug and toxin extrusion 1 transporter on cisplatin-induced adverse events. *Clinical and Experimental Nephrology* **16**, 843–851 (2012).
32. Yokoo, K. *et al.* Enhanced renal accumulation of cisplatin via renal organic cation transporter deteriorates acute kidney injury in hypomagnesemic rats. *Clinical and Experimental Nephrology* **13**, 578–584 (2009).

33. Yamamoto, Y. *et al.* Nephroprotective Effects of Hydration with Magnesium in Patients with Cervical Cancer Receiving Cisplatin. *Anticancer Research* **35**, 2199–2204 (2015).
34. Crona, D. J. *et al.* A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *The Oncologist* **22**, 609–619 (2017).
35. Lee, J. *et al.* Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* **254**, 87–96 (2000).
36. Chen, T. *et al.* Ferroptosis and cuproptosis in kidney Diseases: dysfunction of cell metabolism. *Apoptosis* **29**, 289–302 (2024).
37. Dancis, A. *et al.* Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**, 393–402 (1994).
38. Mandal, T. *et al.* Structural and Functional Diversity Among the Members of CTR, the Membrane Copper Transporter Family. *The Journal of Membrane Biology* **253**, 459–468 (2020).
39. Pabla, N. *et al.* The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **296**, F505–F511 (2009).
40. Aller, S. G. & Unger, V. M. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3627–3632 (2006).
41. Lee, J. *et al.* Characterization of Mouse Embryonic Cells Deficient in the Ctr1 High Affinity Copper Transporter: IDENTIFICATION OF A Ctr1-INDEPENDENT COPPER TRANSPORT SYSTEM*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 40253–40259 (2002).
42. De Feo, C. *et al.* A structural perspective on copper uptake in eukaryotes.

- Biometals* **20**, 705–716 (2007).
43. Ishida, S. *et al.* Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14298–14302 (2002).
 44. Larson, C. *et al.* The Role of the Mammalian Copper Transporter 1 in the Cellular Accumulation of Platinum-Based Drugs. *Molecular Pharmacology* **75**, 324–330 (2009).
 45. Zhou, B. & Gitschier, J. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 7481–7486 (1997).
 46. Holzer, A. K. *et al.* The Copper Influx Transporter Human Copper Transport Protein 1 Regulates the Uptake of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology* **66**, 817–823 (2004).
 47. Yonezawa, A. & Inui, K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *British Journal of Pharmacology* **164**, 1817–1825 (2011).
 48. Claxton, D. P. *et al.* Principles of alternating access in multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. *Journal of Molecular Biology* **433**, 166959 (2021).
 49. Nakamura, T. *et al.* Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* **80**, 1762–1767 (2010).
 50. Tang, C. *et al.* Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. *Nature Reviews Nephrology* **19**, 53–72 (2023).
 51. 前田満和. シスプラチン類縁体の合成研究. 有機合成化学協会誌 **49**, 1021–1031 (1991).

52. 植村雅子 & 米田誠治. 白金制がん剤の今とこれから. *Biomedical Research on Trace Elements* **26**, 157–165 (2016).
53. Raber, J. *et al.* Theoretical Study of Cisplatin Binding to DNA: The Importance of Initial Complex Stabilization. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 11006–11015 (2005).
54. Sies, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* **91**, S31–S38 (1991).
55. 一雄酒居. 酸化ストレスマーカー 8-OHdG の意義と展開. *日本未病システム学会雑誌 = The journal of Japan Miby System Association* **21**, 37–41 (2015).
56. Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* **267**, 6102–6109 (2000).
57. Karlenius, T. C. & Tonissen, K. F. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)* **2**, 209–232 (2010).
58. Mitsui, A. *et al.* Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult t cell leukemia-derived factor /human thioredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186**, 1220–1226 (1992).
59. Chae, H. Z. *et al.* Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice* **45**, 101–112 (1999).
60. Liu, H. & Baliga, R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney International* **63**, 1687–1696 (2003).
61. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).

62. 今井浩孝. 脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスとリポキシトーシス. 基礎老化研究 **43**, 21–29 (2019).
63. Li, Z. *et al.* Overexpression of TNFSF11 reduces GPX4 levels and increases sensitivity to ferroptosis inducers in lung adenocarcinoma. *Journal of Translational Medicine* **22**, 340 (2024).
64. 有澤琴子 & 斎藤芳郎. 鉄依存的な脂質酸化を伴う細胞死フェロトーシスに対するセレン・ビタミン e の作用. 化学と生物 **60**, 573–580 (2022).
65. Li, J. *et al.* Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* **11**, 1–13 (2020).
66. Anzai, N. Cellular properties of renal tubules II: transport of organic solutes. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **50**, 566–569 (2008).
67. Shanley, P. F. & Burke, T. J. Differential Susceptibility to Gentamicin Toxicity Within the Proximal Convolute Tubule. *Renal Failure* **12**, 83–87 (1990).
68. Cristofori, P. *et al.* Renal proximal tubule segment-specific nephrotoxicity: an overview on biomarkers and histopathology. *Toxicologic Pathology* **35**, 270–275 (2007).
69. Gaedeke, J. *et al.* Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrology Dialysis Transplantation* **11**, 55–62 (1996).
70. Hosoyamada, M. *et al.* Cisplatin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV40 large T-antigen gene. *Archives of Toxicology* **70**, 284–292 (1996).
71. Takeda, M. *et al.* Establishment of vasopressin-responsive early proximal tubular cell lines derived from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Biochemistry and molecular biology international* **37**, 507–515 (1995).
72. Fujishiro, H. *et al.* Segment-specific and direction-dependent transport of cadmium and manganese in immortalized S1, S2, and S3 cells derived from mouse kidney proximal tubules. *The Journal of Toxicological Sciences* **44**, 611–619 (2019).

73. Tanaka-Kagawa, T. *et al.* Tubular secretion and reabsorption of mercury compounds in mouse kidney. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **264**, 776–782 (1993).
74. Vinken, P. *et al.* Tissue Kim-1 and Urinary Clusterin as Early Indicators of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Toxicologic Pathology* **40**, 1049–1062 (2012).
75. McDuffie, J. E. *et al.* Time Course of Renal Proximal Tubule Injury, Reversal, and Related Biomarker Changes in Rats Following Cisplatin Administration. *International Journal of Toxicology* **32**, 251–260 (2013).
76. Bonventre, J. V. Kidney Injury Molecule-1: A Translational Journey. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **125**, 293–299 (2014).
77. Prozialeck, W. C. *et al.* Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney International* **72**, 985–993 (2007).
78. Vaidya, V. S. *et al.* Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**, 463–493 (2008).
79. Perše, M. & Večerić-Haler, Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *BioMed Research International* **2018**, e1462802 (2018).
80. Sharp, C. N. & Siskind, L. J. Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **313**, F835–F841 (2017).
81. Yaghobi Joybari, A. *et al.* Oxaliplatin-Induced Renal Tubular Vacuolization. *Ann Pharmacother* **48**, 796–800 (2014).
82. Naganuma, M. *et al.* Analysis of adverse events of renal impairment related to platinum-based compounds using the Japanese Adverse Drug Event Report database. *SAGE Open Medicine* **6**, 2050312118772475 (2018).
83. Kruidering, M. *et al.* Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Porcine Proximal

- Tubular Cells: Mitochondrial Dysfunction by Inhibition of Complexes I to IV of the Respiratory Chain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **280**, 638–649 (1997).
84. Ma, P. *et al.* Enhanced Cisplatin Chemotherapy by Iron Oxide Nanocarrier-Mediated Generation of Highly Toxic Reactive Oxygen Species. *Nano Letters* **17**, 928–937 (2017).
 85. Yu, W. *et al.* Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism. *Scientific Reports* **8**, 4306 (2018).
 86. Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 4210–4221 (2011).
 87. El-Achkar, T. M. & Dagher, P. C. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **308**, F1317–F1323 (2015).
 88. Zhou, J. *et al.* The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Frontiers in Pharmacology* **11**, (2020).
 89. Yonezawa, A. *et al.* Cisplatin and Oxaliplatin, but Not Carboplatin and Nedaplatin, Are Substrates for Human Organic Cation Transporters (SLC22A1–3 and Multidrug and Toxin Extrusion Family). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **319**, 879–886 (2006).
 90. Fujiki, K. *et al.* Blockade of ALK4/5 signaling suppresses cadmium- and erastin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells via distinct signaling mechanisms. *Cell Death & Differentiation* **26**, 2371–2385 (2019).
 91. Su, L.-J. *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, e5080843 (2019).
 92. Deng, F. *et al.* Myo-inositol oxygenase expression profile modulates pathogenic ferroptosis in the renal proximal tubule. *Journal of Clinical Investigation* **129**, 5033–5049 (2019).

93. Ikeda, Y. *et al.* Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **67**, 126798 (2021).
94. Winterbourn, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* **82–83**, 969–974 (1995).
95. Bajbouj, K. *et al.* High-Dose Deferoxamine Treatment Disrupts Intracellular Iron Homeostasis, Reduces Growth, and Induces Apoptosis in Metastatic and Nonmetastatic Breast Cancer Cell Lines. *Technology in Cancer Research & Treatment* **17**, 1533033818764470 (2018).
96. Chirino, Y. I. & Pedraza-Chaverri, J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* **61**, 223–242 (2009).
97. Yang, S. *et al.* Mitochondria targeted peptide SS-31 prevent on cisplatin-induced acute kidney injury via regulating mitochondrial ROS-NLRP3 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**, 110521 (2020).
98. Babior, B. M. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**, 42–47 (2004).
99. Kim, H.-J. *et al.* Roles of NADPH Oxidases in Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Ototoxicity. *Journal of Neuroscience* **30**, 3933–3946 (2010).
100. Meng, X.-M. *et al.* NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via ROS-mediated programmed cell death and inflammation. *Laboratory Investigation* **98**, 63–78 (2018).
101. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* **6**, 183–197 (2015).
102. Nordberg, J. & Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* **31**, 1287–1312 (2001).
103. Singh, M. P. *et al.* Morin hydrate ameliorates cisplatin-induced ER stress,

- inflammation and autophagy in HEK-293 cells and mice kidney via PARP-1 regulation. *International Immunopharmacology* **56**, 156–167 (2018).
104. Han, K.-K. *et al.* Chemical modification of thiol group(s) in protein: Application to the study of anti-microtubular drugs binding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **88**, 1057–1065 (1987).
105. Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 549–557 (2004).
106. Izumi, Y. *et al.* Compensatory role of the Nrf2–ARE pathway against paraquat toxicity: Relevance of 26S proteasome activity. *Journal of Pharmacological Sciences* **129**, 150–159 (2015).
107. Aleksunes, L. M. *et al.* Transcriptional Regulation of Renal Cytoprotective Genes by Nrf2 and Its Potential Use as a Therapeutic Target to Mitigate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **335**, 2–12 (2010).
108. Nebert, D. W. *et al.* ZIP14 and ZIP8 zinc/bicarbonate symporters in *Xenopus* oocytes: characterization of metal uptake and inhibition. *Metallomics* **4**, 1218–1225 (2012).
109. Fujishiro, H. *et al.* Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics* **4**, 700–708 (2012).
110. Zhou, L. *et al.* Alterations in Cellular Iron Metabolism Provide More Therapeutic Opportunities for Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1545 (2018).
111. Meng, F. *et al.* Lysosomal iron recycling in mouse macrophages is dependent upon both LcytB and Steap3 reductases. *Blood Advances* **6**, 1692–1707 (2022).
112. Liu, M.-J. *et al.* ZIP8 Regulates Host Defense through Zinc-Mediated Inhibition of NF- κ B. *Cell Reports* **3**, 386–400 (2013).

113. Pan, H. *et al.* Mitochondrial Modulation by Epigallocatechin 3-Gallate Ameliorates Cisplatin Induced Renal Injury through Decreasing Oxidative/Nitrative Stress, Inflammation and NF- κ B in Mice. *PLOS ONE* **10**, e0124775 (2015).
114. Altındağ, F. Silymarin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by downregulating TNF- α and NF- κ B and by upregulating IL-10. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* **39**, 216–220 (2022).
115. Cao, J. Y. & Dixon, S. J. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 2195–2209 (2016).
116. Ursini, F. & Maiorino, M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radical Biology and Medicine* **152**, 175–185 (2020).
117. Qi, H. *et al.* Myo-Inositol Supplementation Alleviates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury via Inhibition of Ferroptosis. *Cells* **12**, 16 (2023).
118. Tsurusaki, S. *et al.* Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death & Disease* **10**, 1–14 (2019).
119. Yang, X. *et al.* Molecular mechanism of paraquat-induced ferroptosis leading to pulmonary fibrosis mediated by Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Molecular Biology Reports* **50**, 9249–9261 (2023).
120. Hirayama, N. *et al.* Necrosis in human neuronal cells exposed to paraquat. *The Journal of Toxicological Sciences* **43**, 193–202 (2018).
121. Pabla, N. & Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* **73**, 994–1007 (2008).
122. Hosohata, K. *et al.* Early prediction of cisplatin-induced nephrotoxicity by urinary vanin-1 in patients with urothelial carcinoma. *Toxicology* **359–360**, 71–75 (2016).
123. Pezeshki, Z. *et al.* Time course of cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity. *Journal of Nephropathology* **6**, 163–167 (2017).

124. Reifschneider, O. *et al.* Quantitative bioimaging of platinum in polymer embedded mouse organs using laser ablation ICP-MS. *Metallomics* **5**, 1440–1447 (2013).
125. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* **740**, 364–378 (2014).
126. Bauer, O. B. *et al.* Quantitative Bioimaging of Platinum via Online Isotope Dilution-Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry Journal* **90**, 7033–7039 (2018).
127. Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews Journal* **99**, 2467–2498 (1999).
128. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
129. Awuah, S. G. *et al.* Repair shielding of platinum-DNA lesions in testicular germ cell tumors by high-mobility group box protein 4 imparts cisplatin hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 950–955 (2017).
130. Zhu, S. *et al.* DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of Toxicology* **89**, 2197–2205 (2015).
131. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **478**, 23–43 (2001).
132. Makovec, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology* **53**, 148–158 (2019).
133. Tadini-Buoninsegni, F. *et al.* Translocation of Platinum Anticancer Drugs by Human Copper ATPases ATP7A and ATP7B. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 1297–1301 (2014).
134. Ishikawa, T. & Ali-Osman, F. Glutathione-associated cis-

- diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20116–20125 (1993).
135. Hishikawa, Y. *et al.* Overexpression of Metallothionein Correlates with Chemoresistance to Cisplatin and Prognosis in Esophageal Cancer. *Oncology* **54**, 342–347 (2009).
136. Hayakawa, J. *et al.* Inhibition of Extracellular Signal-regulated Protein Kinase or c-Jun N-terminal Protein Kinase Cascade, Differentially Activated by Cisplatin, Sensitizes Human Ovarian Cancer Cell Line *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31648–31654 (1999).
137. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. *Metal-Based Drugs* **2010**, 430939 (2010).
138. Mistry, P. *et al.* The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer* **64**, 215–220 (1991).
139. Guo, J. *et al.* Reprogramming of glutamine metabolism via glutamine synthetase silencing induces cisplatin resistance in A2780 ovarian cancer cells. *BMC Cancer* **21**, 174 (2021).
140. Yanagiya, T. *et al.* Suppression of a High-Affinity Transport System for Manganese in Cadmium-Resistant Metallothionein-Null Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **292**, 1080–1086 (2000).
141. Fujishiro, H. *et al.* The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *Journal of Applied Toxicology* **29**, 367–373 (2009).
142. Aldossary, S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal* **12**, 7–15 (2019).
143. Zhang, B. *et al.* Platinum binding to metallothionein. Analysis of circular

- dichroism spectra of complexes formed between metallothionein and platinum from *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum. *Journal of Inorganic Biochemistry* **58**, 9–19 (1995).
144. Mandal, R. *et al.* Direct evidence for co-binding of cisplatin and cadmium to a native zinc- and cadmium-containing metallothionein. *Applied Organometallic Chemistry* **17**, 675–681 (2003).
145. Karasawa, T. *et al.* Identification of Cisplatin-Binding Proteins Using Agarose Conjugates of Platinum Compounds. *PLOS ONE* **8**, e66220 (2013).
146. Möltgen, S. *et al.* Cisplatin Protein Binding Partners and Their Relevance for Platinum Drug Sensitivity. *Cells* **9**, 1322 (2020).
147. Lamarche, J. *et al.* Mass spectrometry insights into interactions of selenoprotein P with auranofin and cisplatin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **37**, 1010–1022 (2022).
148. 斎藤芳郎. セレノプロテイン P の機能と疾患——疾患バイオマーカーとしての可能性. *Journal of Japanese Biochemical Society* **91**, 686–691 (2019).
149. Saito, Y. Selenium Transport Mechanism via Selenoprotein P—Its Physiological Role and Related Diseases. *Frontiers in Nutrition* **8**, (2021).

発表論文リスト

【本学位論文に関するもの】

第 1 章の内容の一部は、以下の論文で発表済みである。

Comparisons of segment-specific toxicity of platinum-based agents and cadmium using S1, S2, and S3 cells derived from mouse kidney proximal tubules

Hitomi Fujishiro, **Hiroki Taguchi**, Satoko Hamao, Daigo Sumi, Seiichiro Himeno
Toxicology in Vitro. **75**, 105179 (2021)

第 2 章の内容の一部は、以下の論文で発表済みである。

Ferroptosis is involved in cisplatin sensitivity of the S3 segment of immortalized proximal tubule cells

Hiroki Taguchi, Daigo Sumi, Seiichiro Himeno, Hitomi Fujishiro
Toxicology. **506**, 153840 (2024)

第 3 章の内容の一部は、以下の論文で発表済みである。

Cisplatin caused highly delayed cytotoxicity in the immortalized cells derived from S3 segment of mouse kidney proximal tubules

Hiroki Taguchi, Daigo Sumi, Ayumi Uemura, Kanako Matsumoto, Hitomi Fujishiro
Toxicology and Applied Pharmacology. **494**, 117171 (2025)

【その他の発表論文】

Arsenite increases sialic acid levels on the cellular surface through the inhibition of sialidase activity

Hiroki Taguchi, Hitomi Fujishiro, Daigo Sumi
Biochemical and Biophysical Research Communications. **739**, 150973 (2024)

Effects of methylation of arginine residue 83 on the enzymatic activity of human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase

Daigo Sumi, Yuuri Nakamura, **Hiroki Taguchi**, Yasuko Okamoto, Hitomi Fujishiro
Toxicology in Vitro. **93**, 105707 (2023)

CHAC1 exacerbates arsenite cytotoxicity by lowering intracellular glutathione levels

Daigo Sumi, **Hiroki Taguchi**, Kumiko Takeuchi, Hitomi Fujishiro
The Journal of Toxicological Sciences. **48**, 487 (2023)

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導を賜り、金属による生体反応および毒性研究の魅力をはじめ、研究に取り組む楽しさと喜びをご教授いただきました本学衛生化学教室教授 角大悟先生に厚く御礼申し上げます。実験の手技や研究の方向性についてご指導を賜りました本学衛生化学教室准教授 藤代瞳先生に厚く御礼申し上げます。研究者として、そして教育者として私の目標であり、私に研究者として歩むきっかけを示してくださった、本学衛生化学教室前教授 姫野誠一郎先生に厚く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、ご多忙の中、有益なご助言を賜りました本学教授 鈴木真也先生、井上正久先生、深田俊幸先生、本学准教授 堀ノ内裕也先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な試薬をご提供いただき、SeP 研究に関する多くの有益なご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科代謝制御薬学分野教授 斎藤芳郎先生、講師 外山喬士先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金（Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan）より、博士課程の2年間にわたり経済的なご支援を賜りました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

研究室での行事や食事会などを通じて、研究室の良好な雰囲気を作ってくださった本学博士研究員 松本可南子先生に厚く御礼申し上げます。また、衛生化学教室の後輩諸氏のおかげで、充実した研究室生活を送ることができました。厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで支え続け、私に自由にやりたいことをさせてくれた両親、そして亡き祖母に心より感謝申し上げます。