

1 腫瘍形成の機序等に係る OTA 評価書第 1 版以降の追加知見（案）

2
3 【事務局より】

- 4 ・各知見の採用の有無及び記載内容の過不足等について、ご審議ください。
-
- 5 ・細胞名や略称の記載等、全体的な記載の統一については、最終的に評価書全体
-
- 6 を通して対応いたします。

7
8 ・ *in vitro* 試験9 文献リスト No.094 (*in vitro*、ヒト、免疫、MAPK、アポトーシス)

10 H9 細胞（ヒト CD4⁺T リンパ腫由来株）を 0、1、5、10 又は 20 μM の OTA
11 で 0、3、6、12 又は 24 時間ばく露した後、それぞれ一定数の細胞を 24 時間イ
12 ンキュベーションした結果、OTA 濃度及びばく露時間に依存して細胞生存率が
13 低下した。24 時間ばく露の LC₅₀ は、13.75 μM であった。また、DNA ラダー形
14 成は用量依存的に増加し、5 μM 群以上で明確となり、20 μM 群では高分子量の
15 ゲノム DNA の完全な消失を伴う強い DNA 断片化が見られた。細胞は、アポト
16 ーシスの特徴である核の三日月形変形、収縮、縮小、細胞質の高密度化、細胞小
17 器官の密集、ミトコンドリアの膨化、核の濃縮、細胞膜のブルブ形成、出芽によ
18 る核崩壊を示した。初期アポトーシスを示すアネキシン V (AV) 陽性で死細胞
19 の DNA に結合するヨウ化プロピジウム (PI) 陰性を示す細胞の割合は、0、1、
20 5、10 又は 20 μM 群でそれぞれ 1.7、2.7、5.0、6.7 及び 3.2% であった。非アポ
21 トーシス死細胞を示す AV 陰性で PI 陽性を示す細胞の割合は、それぞれ 2.0、
22 2.1、3.8、12.5 及び 23.7% であった。壊死を示す AV 陽性で PI 陽性を示す細胞
23 の割合は、10.7、10.6、18.0、23.8 及び 20.8% であった。また、JC-1 染色によ
24 り、1、5 及び 10 μM においてミトコンドリア膜電位の低下を確認した。アポト
25 ーシスを誘導する Caspase-3 は、対照群に比較して 1、5、10 及び 20 μM 群で、
26 それぞれ 1、5.6、7.8 及び 8.2 倍に増加した。また、同細胞を 1 μM の OTA で
27 1、3、6、9、12、又は 24 時間ばく露した結果、アポトーシスは観察されなかつ
28 たが、p38、ERK1/2 及び JNK のリン酸化が誘導され、6 時間目をピークとして
29 18 時間維持された。次に、同細胞を 0、1、5 又は 10 μM の OTA で 12 時間ば
30 く露した結果、10 μM ではサバイビン mRNA の発現を低下させたが、1 μM 及
31 び 5 μM ではサバイビン mRNA 発現は変動しなかった。24 時間ばく露した結
32 果、5 μM 以上でサバイビン mRNA 発現が抑制された。サイトカインの IL-2 は、
33 1、5 及び 10 μM ばく露の 12 時間後で、それぞれ 11、8 及び 72% 減少し、24
34 時間後で、それぞれ 73、84 及び 81% 減少した。腫瘍壊死因子の TNF- α の mRNA
35 は、10 μM ばく露の 12 時間後に 2 倍、24 時間後に 8 倍に増加した。また、ア

1 ポトース促進因子の Caspase-8 の活性は、10 μ M ばく露の 3 時間後から 24
2 時間後まで経時的に増加した。

3 以上より、OTA はヒト由来 CD4⁺T 細胞にアポトースを誘導した。OTA は
4 ミトコンドリア機能を破綻させることにより MAPK の活性化とアポトースを
5 誘導し、サバイビン、IL-2、TNF- α の発現を変化させた。これらの変化は OTA
6 による免疫毒性機序を説明できる。特徴的な所見として、OTA は CD4⁺T 細胞に
7 Caspase-8 を活性化させたことから、T 細胞が TNF- α をオートクラインすること
8 によって細胞死受容体経路を活性化することが示唆された。

9

10 文献リスト No.165 (*in vitro*、ヒト、ブタ、腎、酸化ストレス)

11 HK2 細胞 (ヒト近位尿細管上皮細胞由来株) 及び LLC-PK1 細胞 (ブタ近位
12 尿細管上皮細胞由来株) を 0.00195~3 μ M の OTA で 6、24、48 又は 72 時間
13 インキュベーションした。HK2 細胞の IC₅₀ は、24、48 及び 72 時間インキュベ
14 ーションでそれぞれ 2、0.382 及び 0.125 μ M であった。LLC-PK1 細胞の IC₅₀
15 は、それぞれ 3 以上、2 及び 1 μ M であった。どちらの細胞も ROS 産生が増加
16 した。ROS から細胞を保護する抗酸化物質のトリペプチドである還元型グルタ
17 チオン (GSH) は、HK2 細胞で 48 及び 72 時間後にそれぞれ 20 及び 15%減少
18 した。ブタ由来の LLC-PK1 細胞では GSH レベルは変化しなかった。ROS の
19 解毒に関わる抗酸化酵素のカタラーゼ (CAT)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲ
20 ナーゼ (G6PD)、グルタチオンペルオキシダーゼ 1 (GPX1)、グルタチオン還
21 元酵素 (GSR) 及びスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) の遺伝子発
22 現を両細胞で測定した結果、LLC-PK1 細胞で G6PD 遺伝子が 6 及び 72 時間後
23 に発現低下、GPX1 遺伝子が 72 時間後に発現低下した。HK2 細胞においては、
24 GPX1 遺伝子のみが 72 時間後に発現低下し、CAT、GSR 及び SOD1 遺伝子は
25 むしろ発現増加した。

26 以上より、ナノモル濃度の OTA はヒト由来の HK-2 細胞とブタ由来の LLC-
27 PK1 細胞に異なる反応性を示し、OTA は HK-2 細胞において酸化ストレス誘導
28 に関与することが見出された。

29

30 文献リスト No.297 (*in vitro*、ヒト、腎、酸化ストレス)

31 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来株) を 0、0.01、0.1 μ M の OTA で 8 時
32 間インキュベーションした結果、アポトースシグナル調節キナーゼ 1 (ASK1)
33 活性は、OTA の処理後 1 時間でピークに達し、その後経時的に減少した。RNA
34 干渉法により遺伝子発現を阻害する Short Hairpin RNA (shRNA) を用いて
35 ASK1 の発現を阻害した結果、ASK1 の発現レベルが 54%減少した。DCFH-DA
36 蛍光染色によって検出される ROS 産生は ASK1 shRNA 細胞で減少した。また、

1 ASK1 shRNA 細胞でアポトーシス初期の特徴であるミトコンドリア膜電位 (Δ
2 ϕm) の低下が亢進した。iTRAQ 定量プロテオミクス解析の結果、OTA ばく露
3 により特定のゲノム配列に一致しない配列を持つスクランブル shRNA 細胞で
4 33 個 (13 個が発現増加、20 個が発現低下)、ASK1 shRNA 細胞で 24 個 (8 個
5 が発現増加、16 個が発現低下) のタンパク質発現変化を示した。ASK1 が関与
6 する DAVID 機能注釈によるパスウェー解析により、24 時間の OTA の持続的ば
7 く露により mRNA スプライシング、ヌクレオチド代謝、細胞周期、DNA 修復、
8 脂質及びリポタンパク質代謝が影響を受け、その全ての代謝経路に対する ASK1
9 の関与が示唆された。スプライセオソーム経路に関連するタンパク質のほとん
10 どは OTA ばく露により発現低下したが、その中に G2/M 期進行の調節因子であ
11 る細胞分裂周期 5 様タンパク質 (CDC5L) が見出された。

12 以上より、OTA は酸化ストレスを介して ASK1 を活性化し、さらに ASK1 自
13 身が ROS 産生の増幅にも関与して毒性を発揮することが示された。活性化され
14 た ASK1 は、DNA 損傷 (ヌクレオチド代謝障害)、細胞周期チェックポイント、
15 DNA 修復機構、RNA 合成阻害など複数の経路を通じてアポトーシスを誘導し
16 た。DNA 損傷が生じると細胞周期チェックポイントが修復機構を起動し、修復
17 に失敗した場合にはアポトーシスが活性化された。同時に、DNA 損傷は RNA
18 合成を抑制し、抗アポトーシス遺伝子の発現低下を引き起こした。

19

20 文献リスト No.376 (*in vitro*、ヒト、尿細管粘膜上皮、シグナル伝達経路)

21 HK2 細胞 (ヒト尿細管上皮細胞由来株) を 0、0.1、1 又は 10 μM の OTA で
22 24 又は 48 時間インキュベーションした。10 μM では、細胞生存率が低下し、
23 Caspase-3/7 活性が増加して Poly (ADP-Ribosyl) Polymerase (PARP) の切断
24 がみられた。この OTA 濃度でヨウ化プロピジウム (PI) 染色とフローサイトメ
25 トリーを用いて解析した結果、PI ヒストグラムの subG0/G1 期における低二倍
26 体細胞の割合が増加した。OTA は PI3K の触媒サブユニットである p110 α の発
27 現を用量依存的に増加させた。10 μM では Akt の Ser473 及び Thr308 残基の
28 リン酸化を増加させ、この Akt の活性化に一致して不活性型の GSK-3 β の Ser9
29 のリン酸化が増加した。PI3K/Akt 経路の負の調節因子である PTEN の Ser380
30 リン酸化も減少した。さらに、発がんに関与するシグナル伝達経路である MAPK
31 のリン酸化 ERK1/2 が 10 μM で増加した。

32 PI3K/Akt 経路抑制剤であるウォルトマニンで HK2 細胞を前処理した結果、
33 10 μM の OTA により誘発された Akt 活性を阻害したが、ERK1/2 リン酸化を
34 増加させて OTA による細胞生存率低下を促進した。MEK/ERK1/2 経路抑制剤
35 である U0126 で HK2 細胞を前処理した結果、10 μM の OTA により誘発され
36 た Akt 活性に影響を与えなかったが、OTA による細胞生存率低下を改善した。

1 また、U0126 処理は、OTA により誘発された低二倍体アポトーシスの割合を低
2 下させた。更に、OTA の 10 μ M で増加した Caspase-3/7 活性は、ウォルトマニ
3 ン処理で増加し、U0126 処理で低下した。

4 ヘムアグルチニンでタグ付けされたドミナントネガティブ MEK1 (MEK1-
5 DN)、キナーゼ不活性 MEK1 (MEK1-KD)、野生型 MEK1 (MEK1-WT) 又は
6 空ベクターを細胞に導入した結果、MEK1-DN 及び MEK1-KD 導入細胞は
7 MEK1/2 伝達経路を阻害し、MEK1-WT 及び空ベクター群に比較して OTA に
8 より誘発された細胞生存率低下を改善した。

9 また、HK-2 細胞を 10 μ M の OTA で 3、6、12 又は 24 時間インキュベーシ
10 ョンした結果、c-MET 受容体型チロシンキナーゼ (RTK) のリン酸化が増加し
11 た。RTK アレイでリン酸化が検出された他のキナーゼとして、Akt、Erk、Src
12 及び rpS6 が見出された。c-MET 受容体のリン酸化は OTA 処理によって増加
13 し、処理の 6 時間後及び 12 時間後でピークに達した。c-MET 受容体特異的阻
14 害剤の PHA-665752 で処理すると、OTA 誘導性 c-MET 受容体及び Akt リン酸
15 化が低下したが ERK1/2 活性は影響を受けなかった。この薬理的な c-MET 受
16 容体阻害は、OTA により誘発される細胞死をウォルトマニンによって誘発され
17 る PI3K 阻害と同等レベルに増強した。

18 以上より、OTA は HK-2 細胞において相反する 2 つのシグナル経路を活性化
19 することが示された。OTA は受容体型 RTK である c-Met を介して PI3K/Akt
20 経路を活性化し、これは OTA 応答に新たに関与する経路である。一方、OTA に
21 よる MEK/ERK1/2 の活性化は、機序は未解明であるもののアポトーシスを誘導
22 した。本研究では、持続的な MEK/ERK1/2 活性化がアポトーシスを媒介する一
23 方、c-Met を介した PI3K/Akt 活性化が抗アポトーシス性の生存シグナルを支持
24 するというモデルが提唱された。これらの結果は、OTA によって障害を受けた
25 ヒト近位尿細管上皮細胞が、生存経路へと導かれる可能性を示し、ヒト腎臓にお
26 ける OTA の腫瘍促進・発がん機構の一端を示唆した。

27
28 文献リスト No.415 (*in vitro*、ヒト、腎、近位尿細管上皮、酸化ストレス)

29 HK-2 細胞 (ヒト近位尿細管上皮細胞由来株) を 0 又は 0.2 μ M の OTA で 48
30 時間インキュベーションを行い、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を
31 実施した結果、投与群の発現変動遺伝子は 3,193 (発現増加: 2,224 遺伝子、発
32 現低下: 969 遺伝子) 遺伝子であった。これらは、機能アノテーション解析の結
33 果、低酸素、上皮間葉転換、アポトーシス及び異物代謝経路に関連していた。RT-
34 qPCR による発現検証解析では、RNA-seq 解析と同様の遺伝子発現パターンを
35 示した。上皮間葉転換マーカーの E-カドヘリン及びフィブロネクチン、アポト
36 ーシスマーカーの Caspase-3 及び Bax さらに腎障害分子-1 (KIM-1) の発現は、

1 siRNA を用いて芳香族炭化水素受容体 (AhR) の発現を阻害することで抑制さ
2 れ、関連する転写因子である Smad2/3 及び低酸素誘導因子の HIF-1 が発現低下
3 した。トランスフォーミング増殖因子 β (TGF-β) 伝達経路の主要な転写因子で
4 ある Smad2/3 の siRNA による抑制は、フィブロネクチン、Caspase-3、Bax 及
5 び KIM-1 の発現を低下させた。HIF-1 の siRNA による抑制は、フィブロネチ
6 ン、Caspase-3、Bax 及び KIM-1 の発現を増加させた。

7 以上より、OTA は腎臓において上皮間葉転換およびアポトーシスを誘導し、
8 これらが腎障害を引き起こすことが示された。さらに、OTA による上皮間葉転
9 換、アポトーシス、腎障害は AhR–Smad2/3–HIF-1 経路と関連して生じる可能
10 性が示された。

11
12 文献リスト No.427 (*in vitro*、ヒト、腎、酸化ストレス)

13 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来株) を 0、0.125、0.25 又は 0.5 μM の OTA
14 で 24 又は 48 時間インキュベーションした結果、低酸素誘導因子 1α (HIF1α)
15 タンパク質レベルが 24 時間後に 0.125 μM 群で増加して、48 時間後に 0.125 及
16 び 0.25 μM で低下した。HIF1α の mRNA の増減は、HIF1α のタンパク質の増
17 減と相関しなかった。ヒートショックタンパク 90 kDa (HSP90) は 24 時間後
18 に全ての OTA 濃度で増加した。48 時間後は、0.125 μM でのみ増加した。ピル
19 ビン酸脱炭酸酵素 1 (PDK1) は、24 時間後に 0.25 及び 0.5 μM で増加し、48
20 時間後に 0.25 μM で低下した。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の mRNA は、
21 24 時間後に 0.25 及び 0.5 μM で低下し、48 時間後に 0.125 及び 0.5 μM で増加
22 した。トランスフォーミング増殖因子 β (TGF-β) の mRNA が 48 時間後の 0.125
23 μM で増加した。エリスロポエチン (EPO) は、24 時間後に用量非依存的な発
24 現変動を示したが、0.5 μM で減少した。一方、48 時間後には 0.5 μM で増加し
25 した。細胞内 ATP 量は、24 時間後の 0.125 μM 及び 48 時間後の 0.25 μM で増加
26 した。

27 以上、ヒト腎細胞における OTA と低酸素応答との新規な相互作用を示した。
28 HEK293 細胞では、24 時間の OTA ばく露により酸化的・代謝的ストレスの増
29 大と潜在的な低酸素状態が生じ、より長時間ばく露により VEGF、TGF-β、EPO
30 などの成長因子遺伝子の発現が亢進し、これらの変化は OTA の毒性および発がん
31 機構への関与を示唆した。

32
33 文献リスト No.488 (*in vitro*、ブタ、腎、尿細管上皮、酸化ストレス)

34 LLC-PK1 細胞 (ブタ近位尿細管細胞由来株) を 0 又は 100 μM の OTA で 24 時
35 間インキュベーションして細胞生存アッセイを実施し、0 又は 25 μM の OTA で
36 24 時間インキュベーションしてその他のアッセイを実施した。25 μM の OTA

1 ばく露で EPO の mRNA 発現が低下し、TGF- β 1 及び β 2 の mRNA 発現が増加
2 した。また、Nrf2、NAD(P)H キノン酸化還元酵素 1 (NQO1) 及び HO-1 の
3 mRNA 発現が低下した。化学的に Nrf2 を活性化するプロスタグランジン J2 の
4 10 μ M 濃度での 6 時間前処理により、OTA に起因する TGF- β 1 mRNA の発現
5 増加が抑制されたが、OTA に起因する EPO、HO-1 及び TGF- β 2 の mRNA 発
6 現の増減は影響を受けなかった。一方、アデノウイルスによる Nrf2 の過剰発現
7 は、OTA に起因する TGF- β 2、HO-1 及び EPO の mRNA の発現変化を抑制な
8 いし反転させた。また、HO-1 の阻害剤であるスズプロトポルフィリン IX
9 (SnPPIX) は、OTA に起因する TGF- β 1 及び β 2 の mRNA の発現増加を増強
10 させた。アデノウイルスを用いた HO-1 過剰発現は、OTA に起因する TGF- β 1
11 及び β 2 の mRNA の発現増加を軽減させた。100 μ M の OTA ばく露で細胞生存
12 率が低下し、アデノウイルスによる Nrf2 又は HO-1 の過剰発現は、OTA に起
13 因する細胞生存率低下を軽減させた。一方、SnPPIX による HO-1 阻害は、100
14 μ M の OTA に起因する細胞生存率の低下を増強させた。100 μ M の OTA でイン
15 キュベーション前に 250 μ M のデフェロキサミン (DFO) で 30 分又は 1,000 μ M
16 の *N*-アセチルシステイン (NAC) で 1 時間前処理した結果、OTA に起因する
17 ROS 産生増加を軽減させた。NAC 処理は OTA によって誘発された細胞生存率
18 低下及び細胞毒性増加を軽減させた。DFO 又は NAC 処理は、OTA に起因する
19 TGF- β 1 及び TGF β -2 の mRNA の発現増加を抑制させた。OTA は miR-17、
20 miR-192 及び miR-200b 等の miRNA の発現を減少させたが、miR-29a、miR-
21 34a 及び miR-129-5p には影響を与えなかった。対照的に、OTA は miR-132、
22 miR-29b、miR-29c 及び miR-200c の発現を誘導した。LLC-PK1 細胞に、特異
23 的なアンタゴミル (抗 miR-132 または抗 miR-200c) をトランスフェクトし、
24 24 時間後に 25 μ M OTA でさらに 24 時間処理した結果、miR-132 の阻害は OTA
25 による Nrf2 mRNA の低下を抑制し、miR-132 ないし miR-200c の阻害はとも
26 みに、OTA による TGF- β 2 発現の増加を抑制し、OTA 誘導性 ROS 産生を阻害し
27 た。

28 以上より、OTA のブタ近位尿管上皮由来の細胞に対する毒性が、Nrf2 およ
29 び HO-1 の抑制による抗酸化応答の減少を介して生じ、ROS の増加とそれに伴
30 う TGF- β 発現の増加を誘導することを示した。OTA による ROS 誘導には、鉄
31 およびグルタチオン恒常性の破綻も関与する可能性が示された。また、Nrf2 の
32 発現誘導を伴わない活性化は防御効果が限定的であった。さらに、miR-132 の
33 発現誘導が OTA による Nrf2 減少に重要であり、HO-1 発現減少は miR-132 に
34 による Nrf2 減少と miR-200c 増加による HO-1 抑制という独立した 2 機構で生じ
35 ることが判明した。miR-132 および miR-200c の同時阻害により、OTA 誘導性
36 の ROS 増加と TGF- β 発現増加は抑制された。これらの結果は、OTA による抗

1 酸化応答抑制の重要性と、その新規機構として miR-132 および miR-200c の関
2 与を示した。

3
4 文献リスト No.588 (*in vitro*、ヒト、腎、酸化ストレス、DNA 損傷、細胞周期)

5 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来株) を 0、12.5、25 又は 50 μM の OTA
6 で 24 時間インキュベーションした結果、OTA ばく露により 12.5 μM から用量
7 依存的に細胞生存率とミトコンドリア膜電位が低下し、ROS 産生が増加した。
8 また、OTA ばく露によりコメットアッセイにおいて DNA 損傷が認められ、DNA
9 二本鎖切断マーカーの γ -H2AX のタンパク質発現が増加した。OTA ばく露によ
10 り細胞周期の分布に変化を示し、用量依存的に G0/G1 期細胞と G2/M 期細胞が
11 減少し、S 期細胞が増加した。また、OTA ばく露によりアポトーシスの形態学
12 的証拠である染色体凝縮を観察し、Hoechst 33342 染色により用量に依存して
13 核の縮小と鮮やかな青色を示すアポトーシス像が増加し、切断型の活性化
14 Caspase-3 も用量依存的に増加した。OTA ばく露の全ての濃度で細胞周期の S
15 期への進入と進行に関わるサイクリン A2、サイクリン E1 及びサイクリン依存
16 性キナーゼ 2 (CDK2) の mRNA レベル及びタンパク質の発現量が無処置対照
17 群に比較して減少した。

18 以上より、HEK293 細胞において OTA ばく露により用量依存的に細胞内 ROS
19 産生の増加、ミトコンドリア膜電位の低下、DNA 損傷が引き起こされることが
20 示された。さらに、OTA は S 期での細胞周期停止およびアポトーシスを誘導し
21 た。これらの結果から、OTA は DNA 損傷とそれに続く S 期停止を介して細胞
22 増殖を有意に抑制することが明らかとなった。S 期停止は、サイクリン A2、サ
23 イクリン E1、CDK2 といった S 期関連タンパク質の発現低下に起因する可能性
24 が示唆された。この OTA 誘発性 S 期停止は、OTA による腎毒性と発がんの機
25 序の一端を示すものと考えられた。

26
27 文献リスト No.636 (*in vitro*、ヒト、腎、肝、伝達経路)

28 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来株) 及び HepG2 細胞 (ヒト肝がん由来細
29 胞株) を 0 又は 25 μM の OTA で 24 時間インキュベーションした結果、OTA
30 ばく露により細胞生存率及びミトコンドリア膜電位が低下した。miRNA は、
31 HEK293 細胞の無処置対照で 22 nt 及び 23 nt でピークを示し、OTA ばく露で
32 も同様であった。HepG2 細胞の無処置対照で 23 nt の割合が 22 nt の割合より
33 わずかに多く、OTA ばく露では 21~24 nt が減少した。HEK293 細胞の OTA
34 ばく露で新たに発現した miRNA は、miR-104-5p、miR-0044-5p、miR-0125-
35 3p、miR-0120-5p 及び miR-0095-5p であった。HepG2 の OTA ばく露では、
36 miR-0115-3p であった。これら miRNA の標的は、HEK293 細胞で発現増加が

1 76 遺伝子で 96 伝達経路、発現低下が 28 遺伝子で 81 伝達経路であった。HepG2
2 細胞では、発現増加が 25 遺伝子で 89 伝達経路、発現低下が 40 遺伝子で 90 伝
3 達経路だった。それぞれの伝達経路の上位の 10 伝達経路の中で 8 伝達経路（が
4 んに関する経路、エンドサイトーシス、軸索誘導、神経膠腫、前立腺がん、MAPK
5 シグナル伝達経路、慢性骨髄性白血病及び神経栄養因子シグナル伝達経路）が共
6 通していた。HEK293 細胞の OTA ばく露では、*DGCR8*、*Drosha* 及び *Dicer1*
7 の mRNA が発現低下し、miR-122 及び miR-4289 が発現増加し、miR-125b 及
8 び miR-375d が発現低下した。HepG2 細胞の OTA ばく露では *Dicer1* の mRNA
9 が発現低下し、miR-125b が発現低下した。両細胞で共通して、miR-184、miR-
10 122-5p、miR-512-3p 及び miR-1 が発現増加し、miR-125b-5p、miR-3529-3p、
11 miR-92a-1-5p、miR-151a-5p 及び miR-365a-5p が発現低下した。

12 本研究は、miRNA の発現異常を介して OTA が HEK293 細胞および HepG2
13 細胞に与える傷害を明らかにした。KEGG 解析の結果、両細胞において共通に
14 発現する miRNA グループは主にシグナル伝達経路に、両細胞で異なって発現
15 する miRNA グループは主にヒトなどのがん関連経路に関与していることが示
16 された。

17

18 (文献リスト NO.636)

19 【渋谷座長からのコメント】

20 データと本文の記載が合わない部分があり、再検討が必要。

21

22 追加確認文献 No.13 (*in vitro*、サル、腎、酸化ストレス)

23 Vero 細胞（アフリカミドリザル腎臓上皮細胞由来株）を 0 又は 10 μ M (IC₂₀)
24 の OTA で 24 時間インキュベーションした結果、10 μ M の OTA で LDH 放出及
25 び亜硝酸塩産生が増加した。10 μ M のケルセチン前処理は、これらの変化を抑
26 制した。また、10 μ M の OTA で 10、15、30、45 又は 60 分間インキュベーシ
27 ョンした結果、15 分後に細胞内カルシウム濃度が増加した。また、OTA による
28 ROS 産生もインキュベーション開始 15 分で始まり 30 分後にピークを示し、そ
29 の後経時的に減少した。ケルセチンによる前処理は、細胞内カルシウム濃度増加
30 及び ROS 産生を抑制した。OTA による脂質過酸化及びタンパク質カルボニル
31 化の増加もケルセチンの前処理で抑制された。さらに、OTA による細胞内の
32 GSH 濃度減少も、ケルセチン前処理で抑制された。OTA 処理で抗酸化酵素の発
33 現減少を生じることが知られているが、これらの抗酸化酵素をコードする遺伝
34 子群の発現誘導により細胞内レドックス環境を制御する Nrf2 は、OTA 処理で
35 発現が減少し、ケルセチン前処理で増加した。ケルセチンは OTA 誘発性のミト
36 コンドリア膜電位の低下を減弱させた。OTA 処理細胞では、subG1 期細胞の割

1 合が対照細胞に較べて飛躍的に増加した。ケルセチン前処理細胞では、OTA 処
2 理群と比較して subG1 期細胞の割合が大幅に減少した。走査電子顕微鏡像では、
3 OTA 処理細胞は膜ブレブ形成などのアポトーシス特性を示したが、ケルセチン
4 前処理によって OTA による膜ブレブ形成が減少した。アポトーシスの初期像と
5 後期像を染色するアクリジン・オレンジとエチジウム・ブロマイドの二重染色を
6 した結果、OTA 処理により、緑色蛍光を呈するアポトーシス初期細胞及び黄橙
7 色蛍光を示すアポトーシス後期細胞が増加した。ケルセチン前処理では、正常な
8 形態を有する無傷の核が観察された。OTA 処理により Caspase-9、Caspase-3、
9 及び poly-ADP ribose polymerase (PARP)の発現が増加したが、ケルセチン前
10 処理により阻害された。コメントアッセイの結果、OTA 処理により DNA 損傷
11 が増加したが、ケルセチン前処理によって OTA 誘発性 DNA 損傷が減少した。
12 小核試験の結果、OTA 処理により小核出現頻度が増加したが、ケルセチン前処
13 理によって OTA 誘発の小核出現頻度が減少した。

14 本研究の結果から、OTA は Vero 細胞において酸化ストレスおよびアポト
15 シスを誘導するが、高い抗酸化能をもつケルセチンの存在下ではこれらの作用
16 が抑制されることが明らかとなった。OTA は細胞生存率の低下および LDH 放
17 出の増加を引き起こしたが、ケルセチンはこれらを回復させることで細胞保護
18 作用を示した。また、OTA は ROS 産生、細胞内カルシウム濃度の上昇および脂
19 質過酸化を誘発することにより酸化ストレスを惹起したが、ケルセチンはこれ
20 らを抑制することで OTA 誘発性酸化ストレスを軽減した。これは、OTA によ
21 って生じるフリーラジカルがケルセチンにより捕捉されることを示している。
22 さらに、OTA は Nrf2 転写経路を抑制するが、ケルセチンは同経路を活性化す
23 ることで OTA による抗酸化防御機構の抑制を改善した。加えて、OTA は
24 Caspase-9、Caspase-3、PARP の発現増加および DNA 断片化を介してアポト
25 シスを誘導するが、ケルセチンはこれらを抑制することで OTA 誘発性アポト
26 シスを防いだ。さらに、OTA は DNA 損傷および小核形成を引き起こすが、
27 ケルセチンはこれらを低減し、OTA に対する抗遺伝毒性作用を示した。

28

29 ・ *in vitro* 及び *in vivo* 試験

30 文献リスト No.105 (*in vivo* 及び *in vitro*、ラット、腎、エピジェネティック)

31 ラット (Wistar、雄、一群 6 匹) に 0 又は 0.210 mg/kg 体重/日の OTA を 270
32 日間 (5 日/週) 経口投与した結果、投与による体重及び腎重量に影響は認められ
33 なかった。また、OTA 投与は、総タンパク質、アルブミン及びグロブリン値に
34 も影響を与えなかった。腎臓の病理組織学的検査では、OTA 投与群で糸球体の
35 縮小、近位尿細管上皮の変性、尿細管の細胞数の増加、巨大核の形成、及び尿細
36 管管腔内のタンパク質円柱の形成がみられた。Masson トリクローム染色では、

1 糸球体、間質及び尿細管基底膜の周囲にコラーゲン沈着がみられた。PAS 染色
2 では、刷子縁の消失を伴う萎縮尿細管の増加、基底膜の肥厚、ならびに尿細管に
3 おけるグリコーゲンの顕著な沈着が認められた。加えて、IV 型コラーゲン、フ
4 イブロネクチン、および PCNA の免疫組織化学染色においても、OTA 投与ラッ
5 トの腎組織では溶媒対照ラットと比較して、これらの線維化促進マーカーの発
6 現増加が認められた。加えて、OTA 投与群で尿中への高濃度のエクソソーム分
7 泌を示した。PKH-67 蛍光標識した尿中エクソソームを単離して NRK52E 細胞
8 (正常ラット腎細胞) とインキュベーションした結果、エクソソームが細胞に取
9 り込まれ核膜近傍に局在した。そこで、NRK52E 細胞を 0、5、10、20、30 又
10 は 40 mg/L の濃度の対照ラットの尿中エクソソーム (NEx) 又は OTA 投与ラ
11 ットの尿中エクソソーム (OEx) で 72 時間インキュベーションした。OEx に曝
12 露された細胞は 30 mg/L までの濃度では細胞毒性を示さず、20 及び 30 mg/L の
13 OEx 濃度で生存細胞の増加が認められた。OEx 40 mg/L の濃度では 10%の細胞
14 死を誘導した。細胞数を反映する総タンパク質量も、20 及び 30 mg/L の OEx
15 濃度で 10~15%増加した。NEx への曝露は 30 mg/L までの濃度では細胞増殖を
16 誘導しなかったが、40 mg/L では、NEx は 8%の細胞死を誘発した。また、
17 NRK52E 細胞を 0、10、20 又は 30 mg/L の NEx 又は OEx の尿中エクソソ
18 ムで 72 時間インキュベーションした結果、OEx ばく露細胞では、増殖マーカー
19 の CD44 及び PCNA が用量依存的に発現増加した。OEx ばく露細胞は、OEx
20 無処理細胞に比較して NRK52E 細胞のコロニー形成能及び創傷治癒能が上昇
21 した。さらに、両エクソソームで NRK52E 細胞を 7 日間インキュベーションし
22 た結果、OEx ばく露細胞は、免疫蛍光染色で用量依存的にフィブロネクチンの
23 発現及び局在が増加した。ウエスタンブロット解析ではフィブロネクチン及び I
24 型コラーゲンの発現が用量依存的に増加し、フィブロネクチンの増加は 20 mg/L
25 群から OEx 無処理細胞に比して有意であった。なお、NEx でインキュベーショ
26 ンした NRK52E 細胞では、フィブロネクチン及び I 型コラーゲンの発現に影響
27 はなかった。また、OEx でインキュベーションした NRK52E 細胞で TGF- β 1、
28 TGF- β R1、p-Smad2、p-Smad3、p-Smad2/Smad2 比及び p-Smad3/Smad3 比
29 が増加した。しかし、Smad2 及び Smad3 の発現レベルは変動しなかった。OEx
30 ばく露細胞では α -SMA の発現及び局在も増加し、ビメンチン及び Slug の mRNA
31 及びタンパク質の発現が増加した。NRK52E 細胞を 10 μ M の TGF- β R1 阻害剤
32 である SB431542 で 60 分間インキュベーションした後、30 mg/L の両エクソソ
33 ムで 72 時間インキュベーションした。インキュベーション後、p-Smad 2、p-
34 Smad 3、PCNA、フィブロネクチン及び I 型コラーゲンの発現についてウエス
35 タンブロット法を用いて測定し、PCNA とフィブロネクチンに関しては免疫蛍
36 光染色も用いて測定した結果、TGF- β R1 阻害剤の前処理は、OTA 投与ラットの

1 尿中エクソソーム誘導性の p-Smad2、p-Smad3、PCNA、フィブロネクチン及
2 び I 型コラーゲンの発現を阻害した。

3 本研究の結果は、ラットへの OTA ばく露がエクソソームの生成と尿中への分
4 泌を増加させることを示唆しており、OTA ばく露ラットの尿由来エクソソーム
5 は、TGF- β 1/Smad2/3 シグナル伝達経路の活性化を介して、正常腎尿細管上皮
6 細胞に線維化促進性変化を引き起こす可能性が示唆された。

7

8 文献リスト No.374 (*in vitro* 及び *vivo*、ラット、腎、DNA 損傷)

9 OTA が近位尿細管上皮細胞において小核を誘発するかどうかを検討するため、
10 ラット腎由来 NRK-52E 近位尿細管上皮細胞を用い、最長 21 日間の OTA の処
11 理後に *in vitro* 小核試験を実施した結果、細胞生存性が許容される用量レベル
12 から小核形成細胞の頻度が増加した。

13 ラット (F344/N、雄、一群 12 匹) に 0、0.070 又は 0.210 mg/kg 体重/日の
14 OTA (巨大核を誘発する腎発がん物質) を 4 又は 13 週間経口投与又は 3-MCPD
15 (巨大核を誘発しない腎発がん物質) を 400 ppm 飲水投与 (32.5 mg/kg 体重/
16 日 相当) した。この他、近位尿細管上皮に巨大核を誘発する腎発がん物質 (TCP、
17 MON)、巨大核を誘発しない腎発がん物質 (TCEP、KBrO₃)、巨大核を誘発す
18 るが腎発がんを誘発しない物質 (PNBA)、及び非発がんの腎毒性物質 (APAP)
19 の 4 又は 13 週間経口投与群を設定した。

20 巨大核の発生頻度は OTA 高用量群の 4 及び 13 週目で増加した。TCP、MON
21 群でも巨大核誘発が確認されたが、TCEP、KBrO₃、APAP 群では巨大核形成が
22 認められなかった。OTA13 週投与の高用量群で発現増加 (2 倍以上) した遺伝
23 子の中から 3-MCPD 群で発現増加 (2 倍以上) した遺伝子を除外した結果、2,145
24 遺伝子が OTA 高用量群で特異的に発現増加した。更にこれらの遺伝子について
25 「分裂 (または分裂期)」、「微小管」、「動原体」、「紡錘体」、「染色体」、「増殖」、
26 「アポトーシス」又は「死」をキーワードとした遺伝子オントロジー解析の結果、
27 17 遺伝子オントロジーが見出された。一方、OTA 高用量群で特異的に発現低下
28 した 1,283 遺伝子の中で濃縮した 110 遺伝子オントロジーは、上記のキーワー
29 ドと関連しなかった。OTA は紡錘体形成チェックポイントの破綻を誘発して染
30 色体不安定性に導く細胞周期制御を標的とする可能性が指摘されているため、
31 OTA 特異的に発現が増減した遺伝子の中から染色体不安定性に関連することが
32 報告されている 32 遺伝子を確認し、これらの遺伝子の定量 RT-PCR による検
33 証解析を実施した結果、OTA 特異的に発現上昇し、MCPD では発現変動しな
34 かった 12 遺伝子 (*Nuf2*、*Ska2*、*Kif11*、*Kif15*、*Kif18a*、*Kif20a*、*Kif26b*、*Lgals3*、
35 *Rad51*、*Rad51ap1*、*Myc* 及び *Cdkn1a*) を得た。次いで、腎臓における *in vivo*
36 小核検出を実施した結果、近位尿細管細胞の細胞内 DNA を染色するフォイルゲ

1 ン陽性小核割合は、OTA 高用量群の 13 週目でも変化は認められなかった。一
2 方、腎髄質外層外帯における γ -H2AX 陽性小核を有する近位尿細管細胞は、OTA
3 高用量群の 13 週目で増加した。TCP、MON 群でも γ -H2AX 陽性小核陽性細胞
4 が 4 週目及び／ないし 13 週目で増加した。さらに、OTA 高用量群で腎組織サ
5 ンプルにおける γ -H2AX 及び N-カドヘリンの二重免疫組織化学染色を実施し
6 た結果、小核が単一細胞内の主要な核と共局在することが示された。髄質外層外
7 帯における PCNA 陽性細胞数は、OTA 高用量群の 4 週及び 13 週目と OTA 低
8 用量群の 13 週目に増加した。TCP、MON 群でも 4 週及び 13 週目に PCNA 陽
9 性細胞数が増加した。

10 以上の結果から、OTA がラット近位尿細管上皮由来細胞において、細胞生存
11 能が許容される用量から長期間ばく露した後でも、*in vitro* で小核形成を誘発す
12 ることが明らかになった。*In vivo* 小核アッセイでは、OTA 投与の用量および期
13 間依存的に γ -H2AX 陽性小核を有する近位尿細管上皮細胞が増加することが明
14 らかになった。OTA 特異的遺伝子発現プロファイリングでは、染色体不安定性
15 誘導に関与する可能性のある遺伝子の発現変化が明らかになった。さらに、 γ -
16 H2AX 陽性小核形成は、巨大核を誘発する腎発がん物質に共通して増殖活性亢
17 進を伴って認められた。これらの結果は、OTA 投与による γ -H2AX 陽性小核形
18 成が、増殖性病変の形成に先立って生じる染色体不安定性および巨大核の誘発
19 と関連している可能性が示唆された。

20

21 文献リスト No.506 (*in vivo* 及び *in vitro*、マウス、腎、フェロトーシス)

22 マウス (C57BL/6、雄、一群 6 匹) に 0 又は 0.8 mg/kg 体重/日の OTA を 7
23 日間経口投与し、試料として血清及び腎臓を採取した。OTA 投与により、血清
24 BUN、CRE 及び尿酸が上昇、腎臓の *Ntn-1*、*Kim-1*、*TNF- α* 、*IL-1 β* 及び *IL-6*
25 の mRNA が発現増加並びに *IL-10* の mRNA が発現低下した。腎臓では更に、
26 フェルネソイド X 受容体 (FXR) タンパク質及び mRNA が発現低下、マロンジ
27 アルデヒド (MDA) 濃度が増加、GSH 濃度低下及び HNE 産生が増加した。ま
28 た、鉄含有量、*Acs14*、*TFR1* 及び *HO-1* の mRNA 及びタンパク質が発現増加、
29 GPX4 及び FTH のタンパク質及び mRNA が発現低下した。病理組織学的検索
30 では、尿細管内腔への壊死細胞の剥離、尿細管の拡張及び蛋白円柱、尿細管上皮
31 の刷子縁構造の消失、リンパ球や好中球などの炎症細胞の浸潤を観察した。腎臓
32 の免疫蛍光染色の結果、コレステロール代謝に関わる核内受容体の FXR が減少
33 した。また、ミトコンドリアの縮小、ミトコンドリア膜の破裂、ミトコンドリア
34 クリステの消失及びミトコンドリアの空胞化を観察した。

35 マウス (C57BL/6、雄、一群 6 匹) に 0 又は 0.8 mg/kg 体重/日の OTA を 3
36 日間経口投与並びに 30 mg/kg 体重/日の FXR 活性剤の GW4064 を 3 日間胃内

1 投与後に 0.8 mg/kg 体重/日の OTA を 3 日間経口投与し、試料として血清及び
2 腎臓を採取した。OTA 投与前の 3 日間の GW4064 投与の結果、GW4064 は OTA
3 誘発性の腎障害を軽減し、血清 BUN、CRE 及び尿酸レベルを低下させ、*Ntn-*
4 *1*、*Kim-1*、*TNF- α* 、*IL-1 β* 及び *IL-6* の mRNA の発現低下と *IL-10* の mRNA の
5 発現増加を誘導し、尿細管上皮細胞の刷子縁消失、尿細管拡張、及び蛋白円柱の
6 出現を改善して好中球指標である Ly6G 陽性領域割合を減少した。マウスに 5
7 mg/kg 体重/日のフェロトーシス阻害剤のフェロスタチン-1 (Fer-1) を OTA 投
8 与前に 3 日間腹腔内投与した後に 0.8 mg/kg 体重/日の OTA を 3 日間経口投与
9 し、試料として血清及び腎臓を採取した結果、血清 BUN、CRE 及び尿酸並びに
10 腎臓における *Ntn-1*、*Kim-1*、*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 及び *IL-10* の mRNA 発現
11 の増加、さらに腎臓の病理学的変化の軽減及び腎臓好中球浸潤が減少した。

12 HK-2 (ヒト近位尿細管上皮細胞由来株) を 0、1.0、2.0 又は 4.0 mg/L の OTA
13 で 24 時間インキュベーション又は 2 μ M の Fer-1 又は 1 μ M の GW4064 で 12
14 時間前処理後に 2.0 mg/L の OTA で 24 時間インキュベーションした。OTA の
15 単独ばく露によって、用量依存的に細胞生存率が低下し、LDH 放出が増加した。
16 また、2.0 mg/L 以上の用量で TNF- α 及び IL-1 β タンパク質発現が増加したが、
17 IL-10 タンパク質発現が低下した。FXR 及び FTH タンパク質発現レベルが 2.0
18 mg/L 以上群で、GSH 含量並びに GPX4 が 1.0 mg/L 以上群で低下し、MDA レ
19 ベル並びに Acsl4、TFR1 及び HO-1 タンパク質発現レベルが 2.0 mg/L 以上群
20 で、細胞内 ROS レベルが 1.0 mg/L 以上群で増加した。Fe²⁺ は 2.0 mg/L 以上群
21 で用量依存的に増加した。GW4064 の 1 μ M 処理により、細胞生存率の増加、
22 LDH 放出の減少、TNF- α 及び IL-1 β タンパク質レベルの低下及び IL-10 タンパ
23 ク質の増加を示して、OTA 誘発性細胞毒性及び炎症を軽減した。また、OTA 誘
24 発性の FXR、GPX4 及び FTH の減少並びに Acsl4、TFR1 及び HO-1 タンパク
25 質及び mRNA 発現レベルの増加を改善した。MDA、細胞内 ROS レベル及び鉄
26 含量の増加及び GSH 含量の減少も回復した。さらに、HNE 陽性領域の増加を
27 軽減した。NAC 前処理は OTA 誘発性の ROS 産生、LDH 活性の上昇及び細胞
28 生存率の低下を抑制した。Fer-1 処理は、OTA によって誘発される細胞生存率
29 低下及び IL-10 タンパク質の低下並びに LDH 活性、TNF- α 及び IL-1 β タンパ
30 ク質の発現増加を回復させた。

31 結論として、OTA ばく露は FXR の発現を抑制し、その結果として脂質過酸
32 化、フェロトーシス、および腎毒性を誘導することが明らかになった。このこと
33 は、OTA 誘発性腎毒性において FXR がフェロトーシスを制御することを通じ
34 て重要な役割を果たすことを示唆した。

35
36

1 ・ *in vivo* 試験

2 文献リスト No.129 (*in vivo*、マウス、腎、酸化ストレス)

3 マウス (CD1、雄、一群 7 匹) に 0、1 又は 10 mg/kg 体重/日の OTA を単回
4 又は 3 日間反復経口投与した。また、0 又は 0.5 mg/kg 体重/日の OTA を 21 日
5 間反復経口投与した。血漿中の OTA 濃度は、1 及び 10 mg/kg 体重/日単回投与
6 群でそれぞれ 0.84 及び 2.72 µg/mL、3 日間投与群でそれぞれ 0.27 及び 1.97
7 µg/mL であった。0.5 mg/kg 体重/日 21 日間投与群では、0.23 µg/mL であった。
8 単回投与では両用量群で腎臓相対重量が増加した。脾臓相対重量は 10 mg/kg 体
9 重/日投与群でのみ増加した。一方、3 日間経口投与群では脾臓相対重量が低下
10 した。21 日間の OTA 投与では腎臓相対重量が低下した。腎臓の病理組織検査
11 では、3 日間投与群で腎皮質内側に尿細管変性を認め、尿細管上皮の散発的壊死
12 と壊死細胞の尿細管腔への剥離、尿細管細胞の多発性の巣状壊死、細胞サイズの
13 縮小、アポトーシス小体の分散、及び核内のクロマチン凝集が観察された。21 日
14 間投与群では、尿細管上皮細胞の再生が見られた。腎臓中の GSH 濃度は、OTA
15 の 1 及び 10 mg/kg 体重/日の単回投与群 (1 日後) において低下したが、3 回投
16 与群 (3 日後) では変化しなかった。OTA の 0.5 mg/kg 体重/日の 21 日間反復
17 投与群でも GSH 濃度が低下した。腎臓中の酸化型グルタチオン (GSSG) 濃度
18 も、OTA の 1 及び 10 mg/kg 体重/日の単回投与群 (1 日後) で低下したが、3
19 回投与群 (3 日後) では変化しなかった。逆に、OTA の 0.5 mg/kg 体重/日の 21
20 日間反復投与群では上昇した。これらの群のうち、10 mg/kg 体重/日 3 日間投与
21 群で腎皮質のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性が低下したが、グルタ
22 チオン還元酵素 (GR) には変動を認めなかった。10 mg/kg 体重/日単回投与群
23 と 1 及び 10 mg/kg 体重/日 3 日間投与群でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ
24 (*Gsta*) mRNA が低下した。また、1 及び 10 mg/kg 体重/日 3 日間及び 0.5
25 mg/kg 体重/日の 21 日間投与群ではグルタチオンペルオキシダーゼ 1 (*Gpx1*)
26 遺伝子 mRNA が低下した。一方、グルタチオンペルオキシダーゼ 2 (*Gpx2*) 遺
27 伝子 mRNA は 3 日間投与群の両用量で低下するものの単回投与群では用量依
28 存的に増加した。OTA の単回投与群 (1 日後)、3 回投与群 (3 日後) のいずれ
29 の用量、及び 21 日間反復投与群において、酸化ストレスで活性化する転写因子
30 Nrf2 の mRNA レベルが増加した。一方、Nrf2 のタンパク質レベルは単回投与
31 群 (1 日後) の両用量で低下するものの、3 回投与群 (3 日後) の 10 mg/kg 体
32 重/日用量で上昇した。21 日間の OTA 投与では、Nrf2 のタンパク質レベルは変
33 動しなかった。これに対し、Nrf2 活性化因子の *Keap1* の mRNA レベルは OTA
34 の単回投与群 (1 日後) の高用量と 3 回投与群 (3 日後) の両用量で低下した。
35 しかし、NRF2 Ser40 リン酸化タンパク質 (NRF2 Ser40-P) のレベルは単回投
36 与群 (1 日後) 及び 21 日間の OTA 投与では増加は認められなかった。抗酸化

1 反応として NQO1 mRNA レベルが OTA の単回投与群 (1 日後)、3 回投与群
2 (3 日後) のいずれの用量においても低下し、グルタチオンシンセターゼ (*Gss*)
3 mRNA レベルも単回投与群、3 回投与群の 10 mg/kg 体重用量で低下した。熱及
4 び酸化ストレスで誘導されるタンパクのヘムオキシゲナーゼ 1 (*HO-1*) mRNA
5 レベルが 3 回投与群の 10 mg/kg 体重用量で増加した。*Sod1* mRNA レベルは単
6 回投与群の 10 mg/kg 体重で増加したものの、3 日間投与群では両用量で低下し
7 た。*Sod2* mRNA レベルは 3 回投与群の 10 mg/kg 体重用量で低下した。抗酸化
8 作用に機能するがん抑制遺伝子産物として知られる HECT ドメインとアンキリ
9 ンリピートを含む E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ 1 (*HACE1*) の mRNA レ
10 ベルと HECT ドメインタンパク質が単回投与群の 10 mg/kg 体重用量で増加し
11 た。3 日間投与群では両用量で低下した。また、*HACE1* の分解標的であるグア
12 ノシン三リン酸フォスファターゼ (*GTPases1*) *Rac1* mRNA レベルが 3 日間投
13 与群の 10 mg/kg 体重/日用量で増加した。

14 本研究の結果から、OTA は腎臓においてフリーラジカル生成を引き起こすこ
15 とが明らかとなった。しかし、この過程は投与量よりもむしろばく露期間に強く
16 依存していた。フリーラジカルの生成は *KEAP1/NRF2/ARE* 経路を活性化する
17 が、その活性化様式は時間および用量に依存した。OTA ばく露により *Nrf2*
18 mRNA レベルは増加し、*Gss* 及び *NQO1* などの抗酸化応答配列 (*ARE*) をプロ
19 モーターに有する抗酸化関連遺伝子群の活性化が示唆されたものの、核内へ移
20 行して *ARE* を活性化する *NRF2 Ser40-P* のレベル増加は認められなかった。
21 *NRF2* 依存性遺伝子の mRNA レベルが低かったことから示されるように、*ARE*
22 の活性化不全は抗酸化防御機構の不全を招き、その結果として酸化ストレスが
23 生じ、最終的に細胞傷害へとつながった。

24

25 文献リスト No.265 (*in vivo*、ラット、腎、DNA 損傷、細胞周期)

26 ラット (F344/NSlc-Tg (*gpt*delta)、雄、一群 10 匹) に 0、0.070、0.210 又
27 は 0.630 mg/kg 体重/日の OTA を 4 週間経口投与し、OTA の発がん標的部
28 位である腎髄質外層を採取して試料とした。*Spi*-アッセイの結果は、著者らの以前の
29 研究と同様であり、*red/gam* 遺伝子における大規模な (>1 kb) 欠失変異を示
30 した。腎髄質外層での *in vivo* コメットアッセイと DNA 損傷/修復関連 mRNA 及
31 びタンパク質発現の解析をした結果、コメットアッセイ陽性とウエスタンブ
32 ットと免疫組織化学染色による γ -H2AX 陽性細胞数及びタンパク質レベルの増
33 加を認め、発がん標的部
34 位での DNA の二本鎖切断誘発が示唆された。相同組み
35 換え修復関連遺伝子の *Rad51* は、0.630 mg/kg 体重/日群で増加し、*Rad51* タ
36 ンパク質レベルも投与群で増加した。*Rad18* 遺伝子も 0.630 mg/kg 体重/日群で
増加した。*Brip1* 遺伝子は、0.070 mg/kg 体重/日以上群で増加した。非相同末

1 端結合関連遺伝子 (*Xrcc5*, *Xrcc6* 及び *Lig4*) は増加しなかった。細胞周期関連
2 遺伝子では、G2/M 期で停止に関与する *Chek1* 遺伝子が 0.070 mg/kg 体重/日
3 以上群で増加、*Wee1* 遺伝子が 0.630 mg/kg 体重/日群で増加した。S/G2 期に関
4 与する *Ccna2* 遺伝子が 0.630 mg/kg 体重/日群で増加、*Cdk1* 遺伝子が 0.210
5 mg/kg 体重/日以上群で増加した。

6 結論として、本研究では発がん用量の OTA が *gpt delta* ラットの DNA の発
7 がん標的部位に DNA の二本鎖切断を誘発することを明確に示した。OTA 誘発
8 DNA 二本鎖切断は主に相同組み換えによって修復され、結果として大規模な欠
9 失変異につながると考えられた。

10

11 文献リスト No.266 (*in vivo*, マウス、腎、p53、DNA 損傷、細胞周期)

12 マウス (p53 発現 *gpt delta transgenic [p53^{+/+}]* 及び p53 欠損 *gpt delta*
13 *transgenic [p53^{-/-}]*、雄、一群 5 匹) に 0 又は 5 mg/kg 体重/日の OTA を 3 日
14 間経口投与し、腎臓を試料としたコメットアッセイで投与群の DNA 損傷を検討
15 した。DNA 損傷の程度は、*p53^{-/-}* 及び *p53^{+/+}* マウスで差が無かった。マウス
16 (*p53^{+/+}* 及び *p53^{-/-}*、雄、一群 10 匹) に同用量の OTA を 4 週間 (5 日/週) 経口
17 投与した結果、*p53^{-/-}* 及び *p53^{+/+}* マウスの投与群で体重及び腎重量が低下した。
18 また、*p53^{-/-}* 及び *p53^{+/+}* マウスで腎臓の髄質外層外帯でアポトーシス及び巨大核
19 形成の割合が増加し、その程度は *p53^{-/-}* マウスよりも *p53^{+/+}* マウスで増加した。
20 アポトーシス細胞の核で Caspase-3 を確認した。OTA を投与した *p53^{+/+}* マウス
21 の尿細管上皮細胞の核で γ -H2AX の核陽性像を示す尿細管上皮細胞数が増加し
22 したが、*p53^{-/-}* マウスでの γ -H2AX 陽性細胞数は OTA 投与により更に増加した。
23 OTA を投与した *p53^{-/-}* 及び *p53^{+/+}* マウスで発現変動に差を認めた細胞周期停止
24 関連 (*Cdkn1a* 及び *Pkmyt1* など)、細胞周期進行関連 (*Ccne1* 及び *Plk1* など)、
25 DNA 二本鎖切断修復 (*Rad51* 及び *Bard1* など)、トランス損傷合成 (*Polk* など)
26 及びプロアポトーシス遺伝子 (*Bax* 及び *Hrk* など) を含む 1,073 個の遺伝子が
27 認められた。その特徴的な遺伝子発現の違いから判断して、OTA 投与 *p53^{+/+}* マ
28 ウスの腎臓では p53 依存的に p21 タンパク質をコードする *Cdkn1a* 発現が増加
29 して、G1/S 期での細胞周期停止が示唆された。一方、OTA 投与 *p53^{-/-}* マウスの
30 腎臓では *Pkmyt1* の発現が増加し G2/M 期での細胞周期停止が示唆された。*p53^{-/-}*
31 マウスでは更に、*p53^{+/+}* マウスと比較して、細胞周期進行関連遺伝子 (*Ccne1*、
32 *Ccnb1*, *Cdk1*, *Plk1*, *Aurka*) や相同組換 (HR) 関連遺伝子 (*Rad51*, *Rad54l*、
33 *Bard1*, *Brip1*) が大きく発現増加した。*Polk* mRNA の発現は、*p53^{+/+}* マウスの
34 みで増加した。また、p53 依存的なプロアポトーシス遺伝子である *Bax* は *p53^{+/+}*
35 マウスのみで発現増加し、それ以外のプロアポトーシス遺伝子 (*Bak1*, *Bbc3*、
36 *Hrk*) は p53 遺伝子の有無にかかわらず OTA 投与により増加した。さらに、マ

1 ウス (*p53^{+/+}*及び *p53^{-/-}*、雄、一群 5 匹) に同用量の OTA を 4 週間 (5 日/週)
2 経口投与し、腎臓を試料として Spi-アッセイを実施した結果、OTA 投与 *p53^{-/-}*
3 マウスでのみ Spi-突然変異体頻度が増加し、塩基欠失、塩基置換、塩基挿入が増
4 加した。

5 結論として、OTA はラットでの観察と同様に、マウスの腎臓の発がん標的部
6 位で DNA 二本鎖切断を誘発した。*p53* は DNA 二本鎖切断の形成とそれに続く
7 遺伝子変異を防ぎ、これはおそらく *p53/p21* を介した細胞周期制御に起因する
8 ものであった。

9

10 文献リスト No.373 (*in vivo*、ラット、腎、遺伝子発現、DNA メチル化)

11 ラット (F344、雄、一群 12 匹) に 0 又は 0.21 mg/kg 体重/日の OTA (巨大
12 核を誘発する腎発がん物質) を 13 週間 (5 日/週) 経口投与又は 3-クロロ-1,2-*p*
13 ロパンジオール (3-MCPD) (巨大核を誘発しない腎発がん物質) を 13 週間飲
14 水投与 (400 ppm) し、近位尿細管上皮細胞において DNA メチル化アレイ及び
15 RNA シークエンシング解析を行った。OTA 投与によって発現増加 (2 倍以上)
16 した 3,066 遺伝子から 3-MCPD 投与によって発現増加 (1 倍以上) した遺伝子
17 を除いた OTA 特異的に発現増加した 1,203 遺伝子を特定した。その中の 41 遺
18 伝子が低メチル化していた。また、OTA 投与によって発現低下した 3,346 遺
19 伝子から 3-MPCD 投与によって発現低下した遺伝子を除いた OTA 特異的に発現
20 低下した 963 遺伝子を特定した。その中の 27 遺伝子が高メチル化していた。
21 OTA 特異的なメチル化・発現の変動を示したこれら遺伝子を遺伝子オントロジ
22 ー解析した結果、高メチル化して発現低下した遺伝子には、発がん過程における
23 代謝リプログラミングに関連する遺伝子 (*Clpx*, *Mrpl54*, *Mrps34*, *Slc25a23*)
24 が含まれていた。メチル化低下して発現増加した遺伝子には、細胞周期停止に関
25 与する *Cdkn1a* に代表される「ヒ素含有物質に対する応答」や細胞増殖促進を
26 増強する *Osm* に代表される「IL-17 産生の正の制御」などの遺伝子が含まれて
27 いた。この他、OTA 特異的にメチル化・発現の変動を示した遺伝子として、NF-
28 κB を介した炎症に関与する *Lrrc14*、DNA 修復に関連する *Gen1*、染色体異常
29 に関連する *Has1* 及び腫瘍の発生と進行に関与する *Anxa3* などが見出された。

30 以上より、3-MCPD に対して同様の発現変動を示す遺伝子を除外することで、
31 OSOM 尿細管において OTA 特異的に誘導される遺伝子を DNA メチル化およ
32 び遺伝子発現の包括的解析により同定した結果、代謝リプログラミング、NF-κB
33 経路を介した炎症、DNA 修復に関与する遺伝子は高メチル化・発現低下を示し、
34 一方で、細胞周期停止、細胞増殖促進、染色体異常、腫瘍の発生・進展に関与す
35 る遺伝子は低メチル化・発現上昇を示した。以上、メチル化と遺伝子発現に関す
36 る網羅的解析により、13 週間の OTA ばく露を行ったラットの腎尿細管におい

1 て発がん過程に関与する多様な OTA 特異的遺伝子が同定された。

2
3 文献リスト No.375 (*in vivo*、ラット、腎、メチル化)

4 ラット (F344/N、雄、一群 12 匹) に 0、0.070 又は 0.210 mg/kg 体重/日の
5 OTA (近位尿細管上皮細胞において巨大核を誘発するラットの腎がん物質) 又は
6 350 mg/kg 体重/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)(TCEP; 巨大核を誘発しな
7 い腎がん物質) 又は 125 mg/kg 体重/日の 1,2,3-トリクロロプロパン (TCP; 巨
8 大核を誘発する腎発がん物質) を 4 又は 13 週間 (5 日/週) 経口投与、400 mg/L
9 の 3-MCPD (巨大核を誘発しない腎がん物質) 又は 500 mg/L (32.5±14.1 mg/kg
10 体重/日 相当) の臭素酸カリウム (KBrO₃; 巨大核を誘発しない腎がん物質) を
11 4 又は 13 週間飲水投与した。また、3,000 mg/kg 飼料のモノロン (MON; 巨大
12 核を誘発する腎がん誘発物質)、10,000 mg/kg 飼料の p-ニトロ安息香酸 (PNBA;
13 巨大核を誘発するが腎発がんを誘発しない物質) 又は 12,500 mg/kg 飼料のアセ
14 トアミノフェン (APAP; 巨大核を誘発しない非腎がん物質) を 4 又は 13 週間
15 混餌投与した。

16 腎髄質外層外帯での DNA メチル化アレイを用いたメチル化 DNA 解析で得ら
17 れた OTA 特異的エピジェネティック変化を示す遺伝子について、メチル化 DNA
18 濃縮 PCR によるメチル化検証解析を実施した結果、OTA 高用量群で *Gen1* の
19 メチル化増加及び *Anxa3*、*Cdkn1a* 及び *Osm* のメチル化低下を示した。

20 腎髄質外層外帯を試料とした mRNA 発現の定量 RT-PCR の結果、*Gen1* の発
21 現は、OTA 高用量群の 4 週後で低下、TCP 群の 13 週後で増加、KBrO₃ 群の 4
22 週後で低下した。*Anxa3* の発現は、OTA 高用量群の 4 及び 13 週後で増加、TCP
23 群の 4 週後で低下、MON 群及び APAP 群の 13 週後で増加した。*Cdkn1a* の発
24 現は、OTA 高用量群、TCP 群、MON 群、の 4 及び 13 週後、TCEP 群、KBrO₃
25 群及び APAP 群の 4 週後、PNBA 群の 13 週後で増加した。*Osm* の発現は、OTA
26 高用量群の 4 及び 13 週後、KBrO₃ 群の 4 週後で増加した。

27 13 週後にこれらの 4 遺伝子の関連遺伝子について定量 RT-PCR 解析を実施し
28 た。*Gen1* 関連遺伝子解析の結果、*H2afx* の発現レベルが OTA 低用量及び高用
29 量群で増加した。*Rad51* の発現レベルは OTA 低用量と高用量群、TCP 群及び
30 TCEP 群で増加した。*Brca1* の発現レベルは OTA 高用量群及び TCP 群で増加
31 した。*Rad50* 及び *Zfp365* の発現レベルは OTA 高用量群で増加した。*Xrcc6* の
32 発現レベルは OTA 高用量群、KBrO₃ 群及び PNBA 群で減少し、TCP 群で増加
33 した。*Xrcc5* の発現レベルは TCP 群、PNBA 群及び APAP 群で増加した。*Lig4*
34 の発現レベルは OTA 高用量群で減少、MON 群で増加した。*Prkdc* の発現レベ
35 ルは APAP 群で増加した。*Xrcc4* の発現レベルは MON 群及び TCEP 群で減少
36 した。*Anxa3* 関連遺伝子解析では、*Hbegf* 及び *Egfr* の発現レベルは OTA 高用

1 量群で増加した。*Cdkn1a* 関連遺伝子の解析では、*Il1b*、*Il7* 及び *Mmp9* の発現
2 レベルが OTA 高用量群で増加し、TCP 群で減少した。*Il1b* の発現レベルは、
3 PNBA 群で増加した。*Il7* の発現レベルは APAP 群で増加した。*Il6* 及び *Hgf* の
4 発現レベルは OTA 高用量群で増加した。*Hgf* の発現レベルは KBrO_3 群で増加
5 した。*Osm* 関連遺伝子解析では、*Osmr* 及び *Socs3* の発現レベルが OTA 低用量
6 群と高用量群で増加し、TCEP 群で減少した。*Osmr* の発現レベルは、更に MON
7 群で増加した。*Ccne1* 及び *Myc* の発現レベルは、OTA 高用量群及び TCP 群で
8 増加した。*Myc* の発現レベルは更に MON 群で増加した。*Fos* の発現レベルは
9 OTA 高用量群で増加した。

10 腎髄質外層外帯を免疫組織化学解析した結果、GEN1 タンパク質陽性尿細管
11 上皮細胞数が OTA 高用量群の 4 及び 13 週後で減少した。ANXA3 タンパク質
12 陽性尿細管上皮細胞数は、OTA 高用量群の 4 及び 13 週後で増加、TCP 群の 4
13 週後で減少した。*Cdkn1a* の翻訳産物である p21^{WAF1/CIP1} タンパク質陽性尿細管
14 上皮細胞数は、OTA 高用量群及び TCP 群の 4 週後並びに OTA 低用量群と高用
15 量群及び TCP 群の 13 週後で増加した。 γ -H2AX タンパク質陽性尿細管上皮細
16 胞数は、OTA 高用量群の 4 週後で増加、OTA 高用量群及び TCP 群の 13 週後
17 で増加した。RAD51 タンパク質陽性尿細管上皮細胞数は、OTA 低用量群と高用
18 量群及び TCP 群の 4 週後及び OTA 高用量群と TCP 群の 13 週後で増加した。
19 TP53BP1 タンパク質陽性尿細管上皮細胞数は、OTA 高用量群の 4 及び 13 週後
20 及び MON 群の 13 週後で増加した。また、TUNEL 染色陽性尿細管上皮細胞数
21 は、OTA 高用量群の 4 週後及び OTA 低用量群と高用量群の 13 週後で増加し
22 た。

23 以上の解析の結果、OTA のラットへのばく露により見出された p21^{WAF1/CIP1}
24 陽性近位尿細管上皮での巨大核細胞の増加は、巨大核と共に小核を形成する腎
25 発がん物質に共通して認められたことから、小核形成を反映し、その結果として
26 染色体不安定性が促進される可能性が示唆された。さらに、OTA による *Cdkn1a*
27 関連遺伝子の発現増加は、発がん環境の形成を促進する細胞老化関連分泌形質
28 の獲得を示唆した。一方で、OTA は GEN1 陽性近位尿細管上皮細胞の減少と、
29 *Anxa3* および *Osm* の発現上昇を特異的に引き起こした。これらの結果から、
30 OTA は自身が誘発する DNA 二本鎖切断の修復経路を *Gen1* の発現抑制によっ
31 て阻害するとともに、*Anxa3* および *Osm* の発現上昇を介して細胞増殖を促進
32 し、増殖性病変形成以前の早期段階から OTA 誘発性腎発がんにおける染色体不
33 安定性の悪化に寄与する可能性が示唆された。

34

35 文献リスト No.479 (*in vivo*、マウス、腎、尿細管上皮、肝、酸化ストレス)

36 マウス (C57BL/6N、雄、一群 6 匹) に 0、0.5、1、2、4 又は 8 mg/kg 体重

1 /日の OTA を 7 日間経口投与した結果、用量依存的に体重が減少した。腎臓の
2 組織学検査では、1 mg/kg 体重/日以上投与群で近位尿細管上皮細胞の管腔内へ
3 の脱落、4 mg/kg 体重/日以上投与群で近位尿細管に一致して上皮細胞壊死、8
4 mg/kg 体重/日群で尿細管壊死が腎臓の 50%以上の領域でみられた。肝臓では、
5 2 mg/kg 体重/日以上投与群で腫大した 2 核肝細胞がみられ、8 mg/kg 体重/日
6 群では多数の肝細胞で腫大・変性とアポトーシスがみられた。血清生化学検査で
7 は、2 mg/kg 体重/日以上投与群でクレアチニン (CRE) が増加し、4 mg/kg 体
8 重/日以上投与群で肝機能マーカー (AST) が増加した。8 mg/kg 体重/日投与群
9 で LDH 及び BUN が増加した。

10 肝臓及び腎臓における組織障害メカニズム解析試験では、両組織において用
11 量依存的に Caspase-3 及び切断型活性化 Caspase-3 と Bax の発現レベルが増
12 加した。これに対応して、1 mg/kg 体重/日以上投与群で TUNEL 陽性細胞が用
13 量依存的に増加した。更に、ネクロプトーシスのマーカーである受容体相互作用
14 タンパク質キナーゼ 3 (RIPK3) 及び混合系統キナーゼドメイン様 (MLKL)
15 タンパク質の発現レベルが 8 mg/kg 体重/日投与群で増加した。酸化ストレス物
16 質の 4-ヒドロキシノネナール (HNE) 及びミトコンドリア分裂制御因子の
17 dynamin-related protein I (DRP1) の発現レベルが 8 mg/kg 体重/日群の肝臓
18 で、4 mg/kg 体重/日以上群の腎臓で増加した。ミトコンドリア分裂因子の MFF
19 の発現レベルが 4 mg/kg 体重/日以上群の肝臓で、8 mg/kg 体重/日群の腎臓で
20 増加した。一方、ミトコンドリア形態制御因子の OPA1 の発現レベルが 2 mg/kg
21 体重/日以上群の肝臓で、8 mg/kg 体重/日群の腎臓で減少した。また、GSH は
22 肝臓では変化しなかったが、腎臓の 8 mg/kg 体重/日投与群で減少した。
23 GSH/GSSG 比は、1 mg/kg 体重/日以上投与群の肝臓と腎臓で減少した。電子顕
24 微鏡検査では、8 mg/kg 体重/日群の肝臓及び腎臓でミトコンドリアの長さ
25 が短縮した。フェロトーシス抑制する抗酸化酵素の GPX4 が 2 mg/kg 体重/日
26 以上の肝臓及び腎臓で用量依存的に減少した。

27 本研究では、OTA のマウス急性期毒性として、肝臓および腎臓の障害を組織
28 学および生化学的に特徴づけた。さらにこれらの OTA 毒性が、酸化ストレス、
29 ミトコンドリア機能障害、ならびにフェロトーシスやネクロプトーシスを含む
30 複数の細胞死機構の関与によって引き起こされることを明らかにした。