

令和元年6月13日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08099

研究課題名(和文)薬剤性腎障害における尿中バイオマーカーの調節分子機構の解明と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanisms in regulation of urinary biomarkers focusing on drug-induced nephropathy.

研究代表者

矢野 貴久(YANO, Takahisa)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：90532846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性腎障害の分子機構を明らかにするために尿細管上皮細胞の障害に着目して検討した結果、MRSA感染症治療薬バンコマイシン(VCM)は、ブタ近位尿細管由来LLC-PK1細胞にカスパーゼ-3/7依存性のアポトーシスを惹起する際、ミトコンドリア機能異常や活性酸素種(ROS)の産生増加に加えて、MAPKであるJNKを活性化し、JNK活性化はROSに非依存的事実であることが示された。それらの障害にはミトコンドリア標的抗酸化薬が有効であり、cAMPアナログはJNK活性化を抑制して保護効果を示した。一方、新たに構築した腎障害バイオマーカーの測定系では、尿や血漿中の10項目について、迅速な評価が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、医薬品により生じる腎臓や尿細管細胞の障害の発現機序や、障害を低減可能な腎保護薬物が明らかとなった。加えて、腎障害の発現や進展に関与する因子に着目して、様々な薬物による腎障害を早期に予知することが可能なバイオマーカーを選定すると共に、わずかな尿や血液によって、迅速な測定や評価が可能な測定系を新たに構築した。薬を使用する際に、尿あるいは血液中のバイオマーカーを定期的に検査することで、腎機能が大きく低下する前に逸早く用量や投与スケジュール、薬剤を変更することが可能になるといった更なる発展が見込まれるとともに、安全で良質な薬物療法の推進につながる意義ある研究成果であることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanisms underlying drug-induced nephropathy, this research firstly focused on the molecular damage of proximal tubular epithelial cell. Anti-MRSA drug vancomycin (VCM) induced caspase-3/7-dependent apoptosis via mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species (ROS) generation and the activation of MAPK JNK. VCM-caused the JNK phosphorylation was independent of ROS production. A mitochondria-targeted antioxidant and cAMP analog reversed the VCM-induced nephrotoxicity, in which cAMP analog suppressed the JNK activation. On the other hand, new measuring method for ten urinary or plasma biomarkers of drug-induced nephropathy is useful for rapid measurement.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬剤性腎障害 尿細管上皮細胞 アポトーシス ミトコンドリア 活性酸素種 MAPK バンコマイシン
バイオマーカー

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

1. 研究開始当初の背景

薬剤性腎障害は、診断もしくは治療のために使用した医薬品による有害反応であり、その発現によって、薬剤の変更や中止、あるいは治療の継続が困難になることがあるほか、予後が極めて不良になることから、実臨床において解決すべき問題の一つとされている。しかしながら、多くの薬剤では、腎臓の細胞や組織に対する直接的な障害作用や、障害発現時の分子機構は、ほとんど明らかにされていない。一部の薬物では、治療薬物モニタリング (TDM) による厳密な血中濃度管理によって、腎障害の発現や重症化の回避に努めているが、TDM の対象とならない薬剤では、腎障害を早期に発見することや発現時期を予測することは極めて難しい。

尿中バイオマーカーは、低侵襲性であり、腎障害の発現の有無を早期に検出できる可能性が高いことから、様々な薬剤によって引き起こされる腎障害を早期に予知することが可能な尿中バイオマーカーの同定や確立、早期の臨床応用が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤性腎障害について、尿細管上皮細胞の障害に着目し、障害発現に係る分子機構の解明や腎保護薬物の探索を行うと共に、腎障害を検出するためのバイオマーカーについて、変動に関わる分子機構の解明や有用性評価、臨床応用のための新規測定系の構築を目的として検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) ブタ腎由来培養尿細管上皮細胞 (LLC-PK1 細胞) を各種培養プレートに播種し、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) 感染症治療薬バンコマイシン (VCM) をはじめとする薬物処置を行った。細胞生存率は、Presto Blue cell viability reagent を使用し、蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定して評価した。アポトーシス細胞は、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) 法を使用し、フローサイトメーターにて蛍光強度を評価し、解析した。一方、MAPK の活性化は、特異的な抗体を用いた Western blot 法によって、総蛋白量に対するリン酸化蛋白量にて評価した。
- (2) カルジオリピン過酸化の評価には 10-N-nonyl acridine orange (NAO) を、ミトコンドリア膜電位変化の評価には JC-1 試薬をそれぞれ使用し、蛍光顕微鏡ならびに Image J にて評価した。
- (3) 雄性 Wistar ラット (200-300g) に VCM (100-200mg/kg) を 1 日 2 回、5 日間腹腔内投与した際の腎臓の機能や障害の程度を、血清尿素窒素 (SUN)、血清クレアチニン (SCr) および尿中 N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) 活性にて評価した。尿細管などの腎組織の病理学的評価には PAS 染色法を用いた。
- (4) 腎障害バイオマーカーおよび調節分子については、Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) のクローニングを行い、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入して KIM-1 発現細胞株を作製し、KIM1 発現 HEK293 細胞や HEK293 細胞、ヒト近位尿細管由来 HKC-8 細胞をそれぞれ用いて評価を行った。細胞接着分子フィブロネクチンの阻害ペプチド pUR4 および対照ペプチド III-11C は、大腸菌に大量発現させた後に Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。各種サイトカインは、蛍光マイクロビーズ法にて測定し評価した。
- (5) 腎障害バイオマーカーの測定については、KIM-1、MCP-1、IL-18、uPAR、BMP-7、EGF、TNF-R1、TNF-R2、TGF- β 1、フィブロネクチンを対象として、蛍光マイクロビーズ法にて新規測定系の構築を行った。同時再現性、日差再現性、希釈直線性および干渉物質に関する検証および、尿検体または血漿検体を用いた際の有用性評価を行った。
- (6) 統計解析において、多群間の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析後、Dunnett test あるいは Tukey-Kramer test により検定を行った。有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

- (1) VCM は尿細管上皮細胞 LLC-PK1 に対して、濃度依存的な細胞生存率の低下を引き起こし、また LLC-PK1 細胞に VCM を処置すると TUNEL 陽性細胞が有意に増加したことから、アポトーシスが引き起こされていることが確かめられた。一方、脂溶性抗酸化薬ビタミン E あるいはミトコンドリア標的抗酸化薬 MitoTEMPO を VCM と併用処置すると、尿細管上皮細胞におけるアポトーシスは有意に抑制されたが、水溶性抗酸化薬であるビタミン C や N-アセチルシステイン、グルタチオンは、いずれも効果を示さないことが明らかになった。その一方で、VCM を LLC-PK1 細胞に処置すると、MAPK である JNK のリン酸化体 (46, 54 kDa) が、処置後 30 分

より有意に増加することが確かめられたが、その JNK リン酸化体の増加は、JNK 阻害薬 SP600125 に加えて、細胞膜透過性 cAMP アナログ Dibutyryl cAMP (DBcAMP)の併用によって有意に抑制されることが明らかになった。一方で、ビタミン E は VCM による JNK 活性化に効果を示さなかったことから、JNK の活性化は活性酸素種 (ROS) とは異なる分子機構にて、尿細管上皮細胞の障害発現に寄与することが示された。加えて、VCM による LLC-PK1 細胞の TUNEL 蛍光強度の増加は、JNK 阻害薬 SP600125 あるいは DBcAMP の併用処置によって顕著に抑制されることが明らかになった。

- (2) VCM は LLC-PK1 細胞に対して、時間依存的な NAO 蛍光強度の低下を引き起こしたことから、尿細管上皮細胞のアポトーシスを引き起こす際に、膜リン脂質カルジオリピンの過酸化を惹起していることが明らかになった。加えて、VCM による NAO 蛍光強度の低下は、脱共役薬 FCCP の併用によって完全に抑制された。一方、LLC-PK1 細胞に VCM を処置した際に、JC-1 蛍光強度の赤色/緑色 比が低下し、ミトコンドリア膜電位が低下していることが確かめられたが、そのミトコンドリア膜電位の低下は、FCCP の併用によって有意に抑制された。すなわち、VCM によって尿細管上皮細胞にアポトーシスが生じる際には、ミトコンドリアスーパーオキシド等の ROS 産生に伴って、カルジオリピンの過酸化が引き起こされ、そのことがミトコンドリア膜透過性の亢進といったミトコンドリア機能のさらなる悪化につながり、細胞死に至ることが示唆された。
- (3) ラットに VCM を連日投与すると、投与開始 5 日後に SUN および SCr が有意に上昇すると共に、腎組織の病理学的評価において、尿細管の空洞化や刷子縁の欠落が認められた。その一方で、尿中 NAG 活性は VCM の投与開始 1 日後から有意に上昇したことから、尿中 NAG 活性を指標とすることで、VCM による腎障害を早期に検出できる可能性が示された。
- (4) 腎障害バイオマーカーや、それらの調節分子について検討するために、フィブロネクチンおよび、フィブロネクチンの阻害ペプチド pUR4、対照ペプチド III-11C、腎線維化メディエーター TGF- 1 を、KIM1 発現 HEK293 細胞や HEK293 細胞、HKC-8 細胞にそれぞれ処置して、サイトカイン量の変化を測定した結果、TGF- 1 の産生増加へのフィブロネクチンの関与が示唆された。
- (5) 10 項目の腎障害バイオマーカー (KIM-1、MCP-1、IL-18、uPAR、BMP-7、EGF、TNF-R1、TNF-R2、TGF- 1、フィブロネクチン) について、新たな測定系の構築を蛍光マイクロビーズ法にて行った結果、各バイオマーカーの単独測定系に加えて、8 項目 (KIM-1、MCP-1、IL-18、uPAR、BMP-7、EGF、TNF-R1、TNF-R2) の同時測定系の構築に至り、数 ~ 数十 μ L の少量の尿検体や血漿検体にて、短時間に複数のバイオマーカーを測定し評価することが可能になった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sakamoto Y, Yano I, Hanada Y, Takeshita A, Inagaki F, Masuda S, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Vancomycin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis via mitochondrial cardiolipin peroxidation in renal tubular epithelial cells., European Journal of Pharmacology, 800; 48-56, 2017 (査読有)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.02.025.

[学会発表] (計 6 件)

矢野貴久、坂本裕哉、稲垣英美佳、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘 . パンコマイシンによる尿細管上皮細胞アポトーシスの分子機構の解明と予防 . 第 45 回日本毒性学会学術年会, 2018

矢野貴久 . 薬物治療と腎障害 薬剤師によるリスクアセスメントとリスクマネジメント . 第 28 回日本医療薬学会年会, 2018

稲垣英美佳、矢野貴久、坂本裕哉、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘 . パンコマイシンによる尿細管上皮細胞障害におけるミトコンドリアの役割と抗酸化薬の効果 . 第 33 回日本薬学会九州支部大会, 2016

坂本裕哉、矢野貴久、稲垣英美佳、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘 . パンコマイシン誘発尿細管上皮細胞アポトーシスにおける ROS および MAPK の役割 . 第 69 回日本薬理学会西南部会, 2016

坂本裕哉、矢野貴久、竹下亜希、稲垣英美佳、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘 . 培養尿細管上皮細胞を用いた薬剤性腎障害の評価系構築 . 第 29 回日本動物実験代替法学会, 2016

坂本裕哉、矢野貴久、花田有希、竹下亜希、稲垣英美佳、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘 . パンコマイシンによる尿細管上皮細胞のアポトーシス分子機構と cAMP アナログによる保護効果 . 日本薬学会第 136 年会, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Joseph V. Bonventre

ローマ字氏名：(Joseph V. BONVENTRE)

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