

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19480

研究課題名(和文)薬剤性腎障害の新規治療戦略：メガリンを標的とした予防・検査法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategies for drug-induced kidney injury: Development of prevention and testing methods targeting megalin

研究代表者

青木 信将 (Aoki, Nobumasa)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60646933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌薬や抗腫瘍薬による腎障害は臨床上的問題となっている。しかし、腎障害を生じる機序は不明な点が多く、その予防方法や検査方法も確立していない。我々は腎尿細管に発現するメガリンに着目し研究を行った。研究の結果、コリスチン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、シスプラチンなどの薬物はメガリンと特異的に結合し、尿細管に取り込まれ蓄積することで尿細管障害を生じることを見出した。またシラスタチンは上記薬剤に対するメガリン結合の拮抗薬として働くことが認められ、動物モデルで腎障害軽減作用が確認された。臨床例においても効果を示唆する結果が認められている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬や抗腫瘍薬による腎障害は、使用薬の制限を招き治療効果の減少につながっている。いずれも疾患の予後に影響する重要な要因である。本研究により、腎障害機序の一端が解明されたのみならず、腎障害予防薬の有望な候補薬の同定に至った。臨床応用することで、抗菌薬や抗腫瘍薬の治療効果の増強やより幅広い患者層への投与が可能になると考えられる。また薬剤性腎障害は慢性腎臓病の原因となる可能性もあり、その予防を図ることで腎機能温存の新たな治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Nephrotoxicity induced by anti-microorganism or anti-cancer drugs is a serious clinical problem. Megalin, an endocytic receptor expressed at the proximal tubules, may mediate the nephrotoxicity of these drugs. The mechanisms underlying the nephrotoxicity are unknown. In this study, using quartz-crystal microbalance analysis, we found that megalin is bound by colistin, vancomycin and cisplatin, and the binding of these drugs to megalin is competed with cilastatin. Using mosaic megalin knockout mice, we revealed that the nephrotoxicity induced by colistin, vancomycin, and cisplatin depends on megalin expression. We showed that colistin-induced nephrotoxicity is suppressed by concomitant cilastatin administration. We also found that cilastatin does not inhibit the anti-bacterial activity of gentamicin, colistin, and vancomycin in vitro. In conclusion, megalin blockade with cilastatin suppresses efficiently the nephrotoxicity induced by gentamicin, colistin, vancomycin, and cisplatin.

研究分野：感染症内科学、呼吸器内科学、腎臓内科学

キーワード：メガリン シラスタチン コリスチン バンコマイシン シスプラチン 薬剤性腎障害

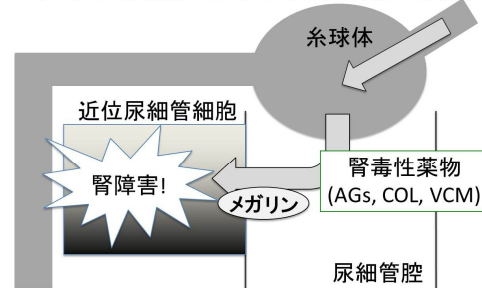
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤性腎障害はしばしば臨床上の課題となる。厚生労働科学研究腎疾患対策事業「CKDの早期発見、予防、治療標準化、進展阻止に関する調査研究」では、薬剤性腎障害の原因として非ステロイド系抗炎症薬(25.1%)、抗腫瘍薬(18.0%)、抗菌薬(17.5%)の順であったと報告している。抗菌薬、抗腫瘍薬は、代替薬がないため使用される例が多く、腎障害は治療の成否と関連し、その回避は喫緊の課題といえる。例えば、近年社会問題となった多剤耐性グラム陰性菌に対する唯一の特効薬 COL は、40%に及び腎障害が報告される。また、蔓延する MRSA に対する VCM も高率な腎障害が知られている。抗腫瘍薬 CDDP については、強い腎毒性が知られるが、肺癌を始めとする複数の悪性腫瘍に第一選択薬となっている。

申請者はこれまで多剤耐性菌感染症に対する新たな治療法の探索を行ってきた。重要な耐性機構であるメタロベータラクタマーゼの阻害剤として Ca-EDTA 製剤を発見し、新規治療薬として報告した(Aoki N, *et al.* Antimicrob Agents Chemother 2010)。COL に関しては、薬物動態の検討から腎障害軽減に関わる投与法の分析を行い(Aoki N, *et al.* J Antimicrob Chemother 2009)、その過程で腎障害の標的分子に注目し、PTEC に発現するエンドサイトーシス受容体メガリンをターゲットとした新規治療戦略の着想に至った。メガリンは PTEC 管腔側において系球体濾過蛋白質の再吸収・代謝を担うが、アミノグリコシド系薬(AGs)では、メガリンを介して尿細管腔から再吸収され高濃度に蓄積した結果、尿細管障害を生じる(図1)。薬剤性腎障害の重要な標的分子と考えられるが、これまでの知見は限られている。

図1 近位尿細管における腎毒性薬物の再吸収



AGs、COL、VCMは系球体濾過後、メガリンにより再吸収されPTECに蓄積、尿細管障害を来す

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎毒性薬剤とメガリンの関連性を解明し、メガリンをターゲットとした腎障害の予防法と検査法を開発し、耐性菌感染症及び悪性腫瘍に対する新しい治療戦略の基盤を確立することである。具体的にはメガリンについて、COL、VCM、CDDP など腎毒性薬剤とメガリンとの結合性と腎障害の誘導性を検討。腎毒性系減薬として有望な、メガリンリガンドであるシラスタチン(CS)について、動物モデルを用いてその効果の検証を行う。また、腎障害の新規検査法としてもメガリンに着目し、尿中メガリンの有用性を臨床患者検体を用いて確認する。

3. 研究の方法

COL、VCM、CDDP 及び CS とメガリンの結合確認

我々は、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーでラット刷子縁からメガリン精製に成功しており、それを利用し水晶発振子マイクロバランス法(QCM法)を用いて精製メガリンとの結合性の解析を行った。具体的には水晶発振子表面に精製メガリンを固定化し、そこへ AGs、COL、VCM、CDDP などを添加、メガリンとの結合量を水晶発振子の振動数の変化として測定し定量を行った。さらにシラスタチン(CS)併用下でも検討を行い、競合疎外の有無についても解析を行った。

マウス薬剤性腎障害モデルを用いた、腎障害とメガリンの関連・CS 予防効果の解析

COL、VCM、CDDP による腎障害マウスモデルを用いて、腎障害発症とメガリンの関与を検討した。我々は既に野生型マウス(C57BL/6)を用いた COL による PTEC 障害モデルを確立した。また、モザイク型腎特異的メガリン KO マウスを用いて、腎毒性薬物とメガリン発現との関連を分析した。腎組織については、形態変化だけでなく、メガリン+KIM-1(尿細管障害マーカー)の2重染色を行うことで、より詳細な検討を行った。さらに、野生型マウスを用いた実験では、COL 投与群、COL+CS 投与群において、腎組織変化・PTEC 障害マーカーを比較することで CS 併用による腎障害が軽減作用を解析している。VCM 腎障害モデル、CDDP 腎障害モデルについても同様に実験を行った。

CS 存在下での VCM 及び COL の抗菌活性の変化の検討

CS 併用下での VCM、COL の抗菌活性について CLSI に準拠し、ディスク法、microdilution プレートを用いて評価した。菌株は VCM に対しては黄色ブドウ球菌標準株 ATCC 25923 株を、COL に対しては大腸菌標準株 ATCC 25922 株を使用した。

臨床症例における CS 腎障害の検討、薬剤性腎障害の新規検査法の開発

薬剤性腎障害との関連が考えられるメガリンについて、その評価系が腎障害の新たな検査法として有用な可能性があり、臨床例で検討を行った。尿中メガリン、特に細胞外領域測定系の A-メガリンと既存のバイオマーカー(KIM-1、シラスタチン C、N-Gal、NAG、β2MG など)について、肺癌治療での CDDP 投与例、MRSA 感染症での VCM 投与例で前向き観察研究による評価を行った。

また、VCM 投与例については後方視的検討により、CS 併用による腎障害軽減作用を解析した。抗菌薬チエナム®については、イミペネムと CS の合剤であり、広く臨床使用されている。今回、VCM とチエナムの併用例をメロペネムなどその他の薬剤との併用例と比較することで検討した。

4. 研究成果

COL、VCM、CDDP 及び CS とメガリンの結合確認

QCM 法を用いた検討で陽性コントロールのゲンタマイシンと同様、COL、VCM、CDDP でも振動数低下が認められた。メガリンのない状況では振動数低下はみられず、メガリンリガンドであることが確認された。尿細管でのメガリンによるエンドサイトーシスが生じている可能性が考えられる。また、CS についてもメガリンリガンドであることが確認され、さらに、CS を前投与した条件で COL や VCM、CDDP の結合の有無を QCM 法で確認すると、振動数低下は認められなかった。CS と COL、VCM 及び CDDP とで競合阻害が起こった結果と考えられる。CS は腎毒性を生じない薬剤であり、薬剤性腎障害に対してメガリンリガンド拮抗剤として有望と考えられる(図 2)。

マウス薬剤性腎障害モデルを用いた、腎障害とメガリンの関連・CS 予防効果の解析

腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウス ApoE-cre において、COL による薬剤性腎障害発現を確認した。投与量に応じて軽度の尿細管障害から重度の糸球体障害まで生じることが腎組織像で認められたが、メガリン染色を行うと、メガリン発現部位に一致して近位尿細管の空胞変性や細胞脱落が生じていた(図 3 A)。さらに尿細管障害を反映する KIM-1 染色においてもメガリン発現部位に一致した尿細管障害が認められている。メガリンと KIM-1 の 2 重染色を行ってみると両者の発現部位はきれいに一致しており(図 3 B)、COL、VCM、CDDP による尿細管障害はメガリン発現に依存することが示された。メガリンによるエンドサイトーシスで腎毒性薬物が尿細管に再吸収され、蓄積した結果、尿細管障害が生じたものと考えられる。

さらに CS の腎障害予防効果を C57BL/6 を用いたマウス腎障害モデルにおいて確認した。COL 投与により尿細管の空胞変性や細胞脱落が生じるが、CS を同時投与することでそれらの障害が軽減していることが確認された(図 4 A)。腎組織変化の半定量や尿中 NAG 分泌量の測定においても、CS 併用での尿細管障害の軽減は有意な変化として示された(図 4 B)。KIM-1 免疫染色を比較しても CS 併用で KIM-1 発現の減少が認められ、CS による尿細管障害軽減作用が明らかとなった。CS は腎毒性を生じないメガリンリガンドであり、COL、VCM、CDDP などと競合阻害することが今回確認されており、メガリンを介する腎障害発現を軽減することが示されたと考える。

CS 存在下での VCM 及び COL の抗菌活性の変化の検討

CS による薬剤性腎障害軽減効果が示されたが、抗菌活性の変化がないか in-vitro で確認している。まずディスク法を用いて、COL 及び VCM

図2 COL、VCM、CDDPとメガリンの結合及びCSによる競合阻害

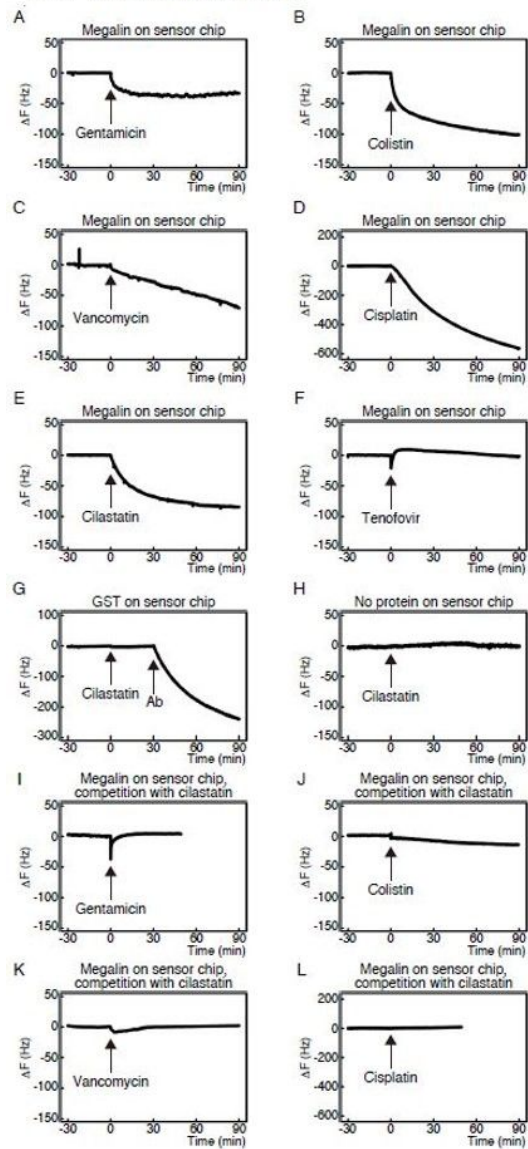
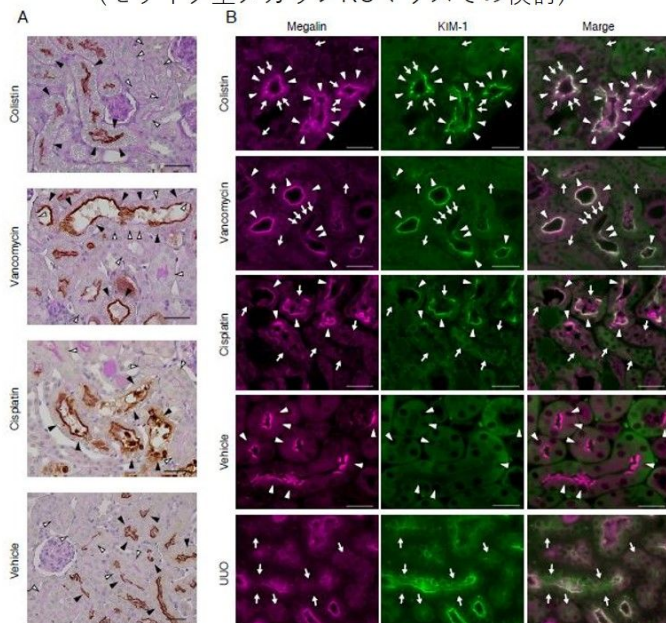


図3 メガリン発現部位と尿細管障害 (モザイク型メガリンKOマウスでの検討)



について CS 存在下での阻止円の変化を測定した。黄色ブドウ球菌標準株 ATCC 25923 株、大

腸菌標準株 ATCC 25922 株いずれに対しても CS 単独では抗菌活性を認めず、VCM・COL 単独と CS/VCM 併用、CS/COL 併用では阻止円径に変化を認めなかった。

臨床症例における CS 腎障害の検討、薬剤性腎障害の新規検査法の開発
 メガリンを介した尿細管障害の検査系として尿中メガリンの測定が有用である可能性があり、他のマーカーとともに臨床例で測定を行った。まず肺癌治療で CDDP 投与を行った症例で前向き観察研究を行った。尿中 A-メガリンにおいて、他のマーカーに比し腎障害発症例で特異的な早期からの上昇が認められた。さらに CDDP により腎障害を生じた症例では投与前尿中 A-メガリンが高値を呈する傾向がみられた。CDDP 投与後の eGFR との相関をみると、投与前尿中 A-メガリンと有意な相関が認められた(図 5)。腎障害の予測マーカーとして有用である可能性を示しており、MRSA 治療に対して VCM 使用例でも前向き観察研究を開始し、現在解析中である。VCM については、臨床例において VCM の併用薬としてイミペネム/CS が用いられた群とその他のカルバペネム系薬が用いられた群を比較することで、CS による腎障害抑制効果の検証も行った。イミペネム/CS が併用された症例では、KDIGO の基準による急性腎障害の発症率が少ない傾向となっていた(イミペネム/CS 群 1/14、7.1% vs. その他のカルバペネム群 40/129、31.0%)。血清クレアチニン値の推移をみても CS 併用群ではクレアチニンの上昇が少ないことが示されている。CS によるメガリンを介した薬剤性腎障害軽減作用を示したものと考えられる。実臨床でもメガリンを介した尿細管障害軽減作用が示されたものと考えられ、現在も使用されている用量で有用な効果を示したことは臨床応用について非常に有望な結果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, De S, Kabasawa H, Kaneko R, Aoki H, Tnabe Y, Kagamu H, Narita I, Kikuchi T, Saito A. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. J Am Soc Nephrol. 2017 Jun;28(6):1783-1791

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 青木信将. メガリンを標的とした、バンコマイシン腎障害の予防及び早期検査法の開発. 第 65 回日本化学療法学会学術集会. 2017 年.
- (2) 青木信将. シンポジウム 耐性菌感染症の新たな治療法の探索 抗菌薬腎障害の機序解明と予防法の開発. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2016 年 4 月 16 日. 仙台国際センター

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 青木信将, 田邊嘉也. 薬剤性腎障害 いかにかえ対応するか! 薬剤性腎障害が疑われる各種患者への実践的アプローチ! バンコマイシンを投与中の MRSA 感染患者. 南山堂. 薬局 68 巻 6 号 2491-2496. 2017 年

図 4 CSの腎障害予防効果 (COL腎障害モデルでの検討 腎組織、NAG、KIM-1)

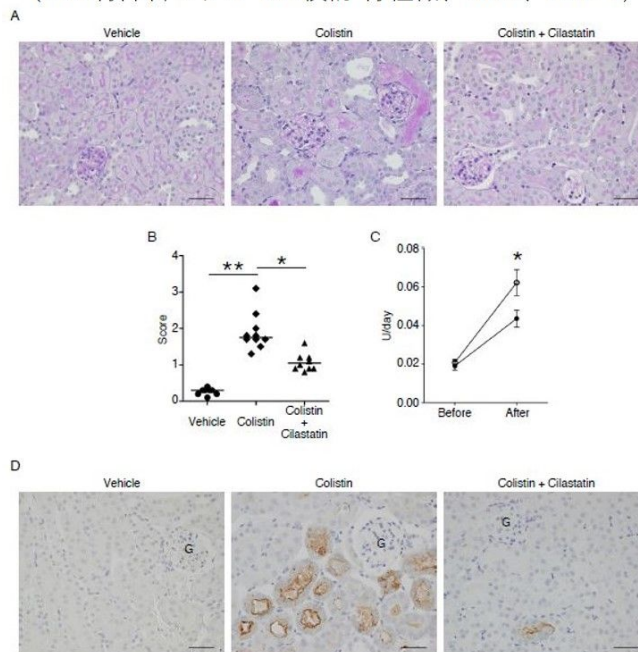


図 5 CDDP投与前尿中メガリン量と投与後eGFR変化量の相関

