

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890246

研究課題名（和文） フロセミドによるゲンタマイシン誘導性腎障害の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Involvement of Megalin in gentamicin-induced acute renal failure

研究代表者

山形 雅代 (YAMAGATA MASAYO)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50454583

研究成果の概要：

利尿薬のフロセミドをブタ腎尿細管由来の培養細胞 LLC-PK1 細胞に添加したが、エンドサイトーシス受容体であるメガリンの発現が遺伝子レベルで明らかな増加は認めなかった。また、マウスにフロセミドを投与した場合も正常と比べ、メガリンの発現部位に変化は認めなかった。アミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを前投与したマウスにおいて、フロセミドによるメガリンの発現誘導は確認できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1280000	0	1280000
2008年度	1310000	393000	1703000
年度			
年度			
年度			
総計	2590000	393000	2983000

研究分野：腎臓薬理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・応用薬理学

キーワード：抗生物質・臓器障害・エンドサイトーシス受容体・タンパク尿

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系抗生物質の一つであるゲンタマイシンは、敗血症や肺炎、膀胱炎などに処方されている。広い抗菌スペクトルを持つ一方、副作用として腎障害や難聴などが知られている。この副作用のうち腎障害は、腎臓の近位尿細管刷子縁に発現しているエンドサイトーシス受容体であるメガリンにより、ゲンタマイシンがほぼ100%細胞内へ取り込まれ蓄積することにより細胞障害が

生じることが報告されている(Schmitz C, et al. J Biol Chem 2002)。細胞内に取り込まれたゲンタマイシンは、細胞内に蓄積し、最終的にアポトーシスを生じさせると報告されている(Servais H, et al. Antimicrob Agent Chemther 2006)。

このゲンタマイシンの腎障害は、浮腫や高血圧症で処方されるループ利尿薬のフロセミドとの併用により、増悪することが臨床的に知られている。これまでに、ブタの腎臓上皮

細胞由来の培養細胞株である LLC-PK1 細胞を用いた検討でフロセミドがゲンタマイシンの細胞内取り込みを促進するという報告がなされている (Nakahama H, et al. Nephron 1989)。しかしながら、生体内におけるゲンタマイシンとフロセミドとの相互作用の作用機序についてはよく分かっていない。メガリンは、腎近位尿細管、小腸上皮、内耳、胎盤、副甲状腺などに発現しているが、腎近位尿細管刷子縁では、糸球体をろ過したビタミン D 結合蛋白質 (DBP)、トランスコバラミン、副甲状腺ホルモン、アミノグリコシド系抗生物質など様々な分子を細胞内に取り込む作用を示す。LLC-PK1 細胞にもメガリンは発現しており、フロセミドがメガリンに作用しゲンタマイシンの取り込みを促進したと考えられる。今回、フロセミドがメガリンにどのような影響をもたらすか、ゲンタマイシンの腎障害を増悪させるかを解明する。

2. 研究の目的

ゲンタマイシンは、メガリンにより腎臓近位尿細管細胞内に取り込まれ、蓄積し、アポトーシスを生じることにより腎障害を示す。この腎障害は、フロセミドにより増強する。LLC-PK1 細胞において、フロセミドはゲンタマイシンの細胞内への取り込みを促進する。これらのことより、本研究では、フロセミドによるゲンタマイシン誘導性腎障害の増強作用のメカニズムにおけるメガリンの関与について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性ラットの右腎を摘出 2 週間後、左腎動静脈を 45 分間阻血し再灌流した。右腎摘出のみを施したものを対照群 (Sham) とした。

① 虚血再灌流、直後、2 時間後、6 時間後に採血し、血清尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (Cr) をそれぞれクレアチニンテストワコー、尿素窒素 B テストワコー (いずれも和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

② 再灌流後より 2 時間あるいは 6 時間代謝ケージにて尿を採取し、採取した尿を用いて、尿中クレアチニン、尿中総蛋白 (マイクロ TP テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。血清クレアチニンと尿中クレアチニンよりクレアチニンクリアランス (CCr) を算出した。

③ 採取した尿を用いて、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、銀染色を行った。また、電気泳動後、PVDF 膜に転写し、anti-DBP 抗体 (Dako) を用いて、western blot を行

った。

④ 再灌流直後、2 時間後、4 時間後に腎臓を摘出し、ホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。作製後、薄切し、H.E 染色を行った。また、anti-Megalin 抗体を用いて、免疫染色を行った。

⑤ 摘出した腎臓より total RNA を抽出し、random hexmer を用いて cDNA 合成した。合成した cDNA を鋳型として rat の megalin を特異的に増幅する primer を用いて PCR を行った。また、 β -Actin の primer を用いて PCR を行った。PCR 後、電気泳動を行い、バンドを Photoshop に取り込み、Image J を用いてバンドの濃さを数値化した。

(2) ブタの腎臓上皮細胞由来の培養細胞株 LLC-PK1 細胞を 6 well dish に撒き込み、最終濃度 0, 0.5 μ M, 500 μ M でフロセミドを添加し、3 時間後、6 時間後に total RNA を抽出した。random hexmer を用いて cDNA 合成した。合成した cDNA を鋳型として pig の megalin を特異的に増幅する primer を用いて real time PCR を行った。

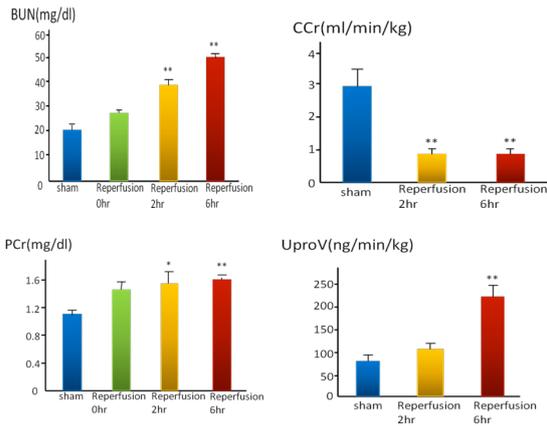
(3) C57BL6 雄性マウスにゲンタマイシン (GM:150mg/kg/day, i.p.)、フロセミド (Fu:100mg/kg/day, i.p.)、ゲンタマイシン + フロセミド (ゲンタマイシン 150mg/kg/day, i.p.、フロセミド 100mg/kg/day i.p.) を 5 日間投与し、5 日目投与後 3 時間後に腎臓を摘出した。対照として、生理食塩水を腹腔内投与した個体 (sham) あるいは正常の個体 (Nor) を用いた。

① 摘出した腎臓より、total RNA を抽出後、random hexmer を用いて cDNA 合成した。合成した cDNA を鋳型として mouse の megalin を特異的に増幅する primer を用いて PCR を行った。また、 β -Actin の primer を用いて PCR を行った。

② 摘出した腎臓を OTC compound で包埋し、凍結切片を作製した。作製した切片を用いて anti-Megalin 抗体を用いて免疫染色を行った

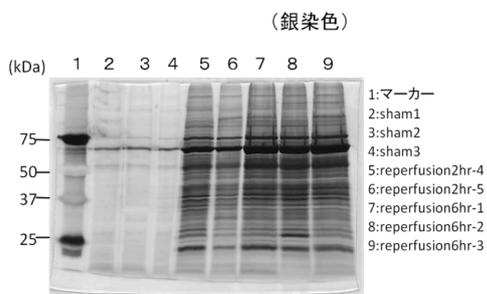
4. 研究成果

(1) ① 虚血再灌流処置後の腎機能マーカー虚血再灌流 2 時間後より BUN は優位に上昇し、CCr は優位に低下した。このことより虚血再灌流 2 時間後より腎機能障害が認められた。また尿中タンパク (UproV) は、再灌流 6 時間後で有意に増加していた。



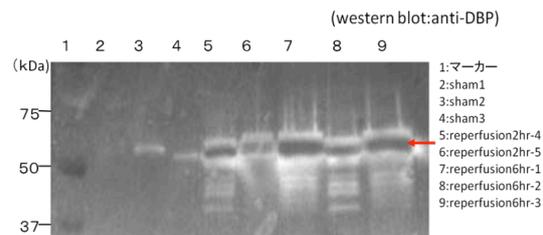
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with sham

②尿中タンパクの増加



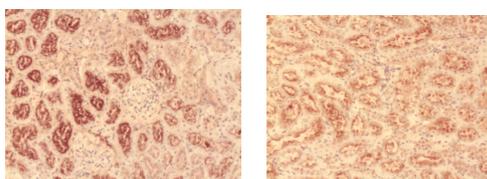
虚血再灌流 2 時間 (lane5,6)、6 時間 (lane7-9)、では、対照群 (lane2-4) に比べ低分子量たんぱくの尿中排泄が増加していた。

③DBP の尿中排泄の増加

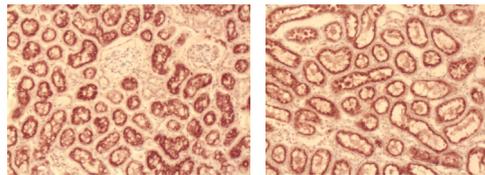


虚血再灌流 2 時間 (lane5,6)、6 時間 (lane7-9)、では、対照群 (lane2-4) に比べ、尿中への DBP の漏出が増加している。

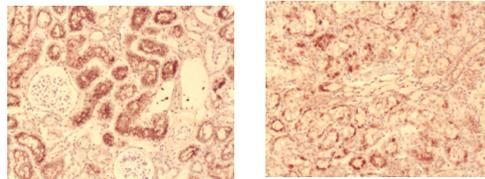
④メガリンの発現 (免疫染色) 正常



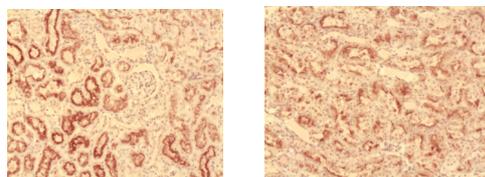
再灌流 0 時間



再灌流 2 時間

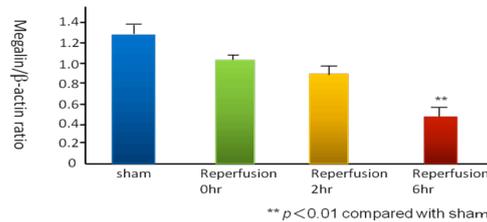
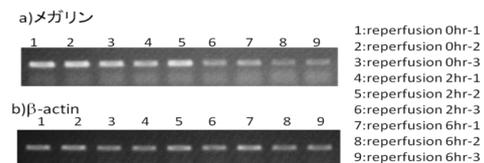


再灌流 6 時間



左側に腎皮質、右側に腎髄質外層外帯の組織写真を示す。これらの免疫染色の結果より、再灌流処置による尿細管の管腔構造の破壊はほとんど認められなかった。腎皮質でのメガリンの発現に差は認めなかったが、腎髄質外層外帯に位置する尿細管でのメガリンの発現が低下していた。

⑤メガリンの発現 (RT-PCR)

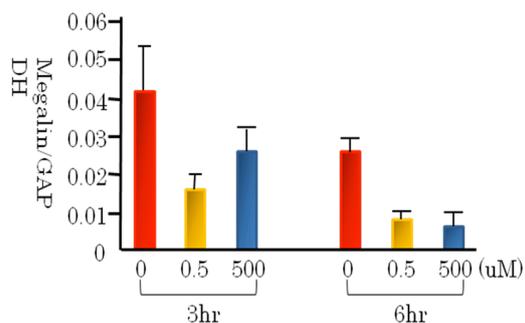


再灌流処置によりメガリン遺伝子発現量が減少しており、再灌流 6 時間後で有意に減少していた。

以上のことより、腎虚血再灌流 2 時間後より腎機能障害が認められ、同時に低分子量たんぱくの尿中への漏出も認められた。虚血再灌流 2、あるいは 6 時間後では、組織障害は認

めていないが、メガリンの発現量が低下しているため、低分子たんぱく尿を呈したと考えられる。急性腎不全のモデル動物である腎虚血再灌流ラットにおいて、腎機能障害は生じているが、組織障害は認めていない状態で、メガリンの発現が低下したことにより、低分子量タンパク尿を呈したと考えられる。急性腎不全モデル動物におけるタンパク尿の出現とメガリンの発現を検討した報告はなく、新たな知見と言える。

(2) LLC-PK1 細胞におけるフロセミド添加によるメガリン遺伝子発現の変化



LLC-PK1 細胞に最終濃度 0, 0.5 μ M, 500 μ M でフロセミドを添加し、RNA を抽出後、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、real time PCR を行ったところ、メガリン遺伝子の明らかな発現量の増加は認められなかった。このことより、フロセミドはメガリン遺伝子の発現に影響を与えていないと考えられた。しかし、LLC-PK1 細胞にフロセミドを添加することにより、ゲンタマイシンの細胞内への取り込みが促進されることを考えると、フロセミドにより、メガリンのエンドサイトーシスが亢進すると考えられる。今後、LLC-PK1 細胞にメガリンリガンドとして知られ Receptor-associated protein(RAP)をフロセミドと同時に添加することにより、RAP の細胞内への取り込みが促進されるか検討を行う必要がある。

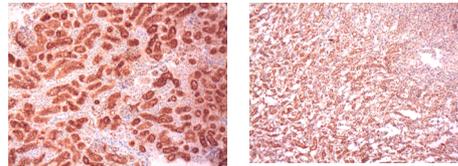
(3) ①ゲンタマイシン、フロセミド、あるいは両方を投与したマウスの腎臓より total RNA を抽出後、cDNA を合成し、mouse の megalin の primer を用いて PCR を行った。



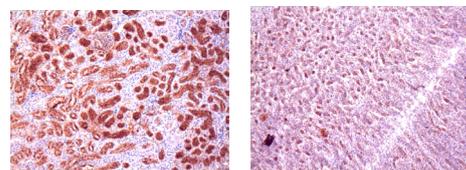
ゲンタマイシン、フロセミド、あるいは両方を投与してもメガリン遺伝子の発現に差は認められなかった。

②ゲンタマイシン、フロセミド、あるいは両方を投与した雄性マウスの腎切片を用いたメガリンの発現 (免疫染色)。

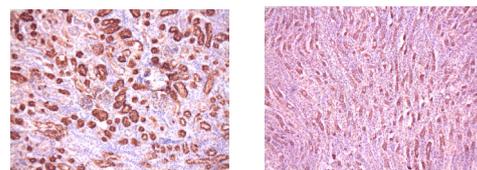
正常



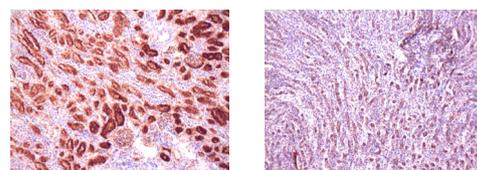
ゲンタマイシン(150mg/kg/day)



フロセミド(100mg/kg/day)



ゲンタマイシン+フロセミド



ゲンタマイシンを 5 日間連続投与したが、BUN は正常とほとんど差はなく、腎機能は低下しなかった。組織を見ても、尿細管障害は認められなかった。左側に腎皮質、右側に腎髄質内層の写真を示す。メガリンの発現も、正常と差はなかった。フロセミドの連続投与によっても、BUN は正常と差はなく、腎機能は低下しなかった。組織を検討しても、組織障害は認めず、メガリンの発現も正常と差はなかった。ゲンタマイシンとフロセミドの同時投与によっても、BUN は正常と差はなく、また組織障害も認めなかった。メガリンの発現も正常と同程度であった。しかし、ゲンタマイシン、フロセミド、あるいは同時投与において、腎髄質内層のあたりに正常に比

べ強いシグナルを認めた。今回用いたメガリンの抗体は、メガリンの細胞内ドメインを認識する抗体であり、メガリンの発現が新たに認められたのかもしれない。さらなる検討が必要と思われる。今回行った投与計画では、ゲンタマイシンによる腎障害が認められなかった。しかしゲンタマイシン 500mg/kg を単回投与すると、投与した半数が死亡してしまい、検討できなかった。今後、ゲンタマイシン、フロセミドの投与計画を検討しなおし、メガリンの発現につて、遺伝子レベル、タンパクレベルで検討しなおしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Miyoshi Y, Akagi M, Agarwal AK, Namba N, Kato-Nishimura K, Mohri I, Yamagata M, Nakajima S, Mushiake S, Shima M, Auchus RJ, Taniike M, Garg A, Ozono K. Severe mandibuloacral dysplasia caused by novel compound heterozygous ZMPSTE24 mutations in two Japanese siblings. Clin Genet. 査読有、73(6), 2008, 535-44

[学会発表] (計 1 件)

- ① 山形雅代、腎虚血再灌流モデルラットにおけるタンパク尿出現におけるメガリンの関与、日本薬学会、第129年会、2009、3：京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 雅代(YAMAGATA MASAYO)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50454583

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者