

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03763

研究課題名（和文）iPS細胞とH2ガスを利用した網羅的アプローチによる急性腎障害への新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic agents for acute kidney injury

研究代表者

本間 康一郎（Homma, Koichiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：10383762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：急性腎障害は救急、集中治療領域で発症率が高く、集中治療室で発症すると死亡率が高いことが報告されている。さらに、長期死亡率との相関や慢性腎臓病の独立したリスクファクターであることも多数報告されている。そのような状況にも関わらず、急性腎障害に対する特異的治療薬はなく、その開発が喫緊の課題である。本研究では、社会的に重要な課題にも関わらず特異的治療法が存在しない急性腎障害に対する新規治療薬を見出すことを目的とし、薬剤スクリーニングを行なったが、有効な化合物を見出すことができなかった。本研究結果を基盤として、引き続き検討を継続する所存である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害（AKI）は救急・集中治療領域で発症率が高く、集中治療室で発症すると死亡率が60%に及ぶと報告されている。さらに、長期死亡率との相関や、慢性腎臓病（CKD）の独立したリスクファクターであることが多数報告されており、AKI発症後、見かけ上は腎臓機能が改善しても腎臓寿命が短縮し、医療経済を圧迫している血液透析導入患者の増加に関与している。昨今、高齢者の増加に伴い、AKIは今後益々増加することが予想される。しかし、特異的かつエビデンスに支持された治療法はなく、特異的治療法の開発は喫緊の課題である。本研究の継続によりドラッグリポジショニングによる新規治療薬の開発が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Acute kidney injury (AKI) has a high incidence in the emergency and intensive care areas, with mortality rates as high as 60% when it occurs in the intensive care unit. In addition, it has been reported to correlate with long-term mortality and to be an independent risk factor for chronic kidney disease (CKD) in a number of studies. However, there are no specific and evidence-supported treatments, and the development of specific therapies is an urgent issue. In this study, we conducted a drug screening to find novel therapeutic agents for acute kidney injury (AKI), for which there are no specific treatments despite the social importance of the disease. Based on the results of this study, we will continue our investigation.

研究分野：救急医学

キーワード：急性腎障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (Acute Kidney Injury; AKI) は救急・集中治療領域で発症率が高く、集中治療室で発症すると死亡率が 60%に及ぶと報告されている。さらに、長期死亡率との相関や、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)の独立したリスクファクターであることが多数報告されており、AKI 発症後、見かけ上は腎臓機能が改善しても腎臓寿命が短縮し、医療経済を圧迫している血液透析導入患者の増加に関与している。昨今、高齢者の増加に伴い、集中治療室入室する患者も高齢化しており、AKI は今後益々増加することが容易に予想される。しかしながら、特異的かつエビデンスに支持された治療法はなく、AKI に対する特異的治療法の開発は喫緊の課題である。そのような状況下で、AKI の主因は尿細管上皮細胞の障害であり、尿細管上皮細胞の障害が周囲の線維芽細胞の形質転換を起し、線維化を引き起こすことが証明され、また、尿細管上皮細胞の障害の強さと頻度が CKD への移行に重要であることが報告された。これにより、AKI の発症予防および治療に最も重要なことは、尿細管上皮細胞の保護であることが明確となった。

2. 研究の目的

本研究の目標は、社会的な重要課題にも関わらず特異的治療薬が存在しない急性腎障害に対する新規治療薬を見いだすことである。

3. 研究の方法

細胞株としてヒト腎臓近位尿細管上皮細胞を用いた。治療候補薬として 184 化合物を用いて、イオメプロールまたは過酸化水素による細胞死抑制効果を、WST-8 アッセイにより評価した。治療候補薬の濃度は 0.1 μM と 1 μM の両濃度を検討した。

(1) 試薬調製

[PBS-作製]

塩化ナトリウム 80 g、塩化カリウム 2 g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 36.3 g、リン酸二水素カリウム 2.4 g を秤量し、900 mL の精製水に溶解させ、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH 7.4 に調整し、精製水で 1 L にメスアップしたものを 10 倍濃縮品とした。使用する際は精製水で 10 倍に希釈し、オートクレーブで 121、20 分間加熱処理した。

[培地調製]

Clonetics®REBM™SingleQuots®, rhEGF 0.5mL、INSULIN 0.5mL、HYDROCORTISONE 0.5mL、GA-1000 0.5mL、FBS2.5 mL、EPINEPHRINE0.5 mL、T3 0.5 mL、TRANSFERRIN 0.5 mL を 37 で温め溶解後、すべてを混合する。

[刺激剤調製]

刺激剤には過酸化水素、イオメロン®を用いた。過酸化水素は酸化ストレスの指標として実験ごとに調製を行い、希釈時にはリン酸緩衝食塩水(PBS-)を用いた。過酸化水素原液 20.43 μM と PBS- 79.57 μM を混合し 2 M 過酸化水素溶液を作成した。これを各実験時に希釈して使用した。イオメロン®は無血清培地を用いて希釈を行った。

[NAC 調整]

保護剤のポジティブコントロールとして NAC を用いた。NAC は 3.26 mg をマイクロチューブに入れ、窒素置換した袋にシリカゲルと共に入れて保存した。使用時には、DMSO 20 μ L、PBS-980 μ L で溶解し 20 mM として、実験時に希釈して使用した。希釈時には治療候補薬と条件を合わせるように DMSO を添加して調製した。

(2) 細胞培養

ヒト腎臓近位尿細管細胞(RPTEC) は、-80 $^{\circ}$ C で保存し、使用時には 37 $^{\circ}$ C で溶解して解凍した。RPTEC 細胞をフラスコに播種し、10 ng/mL のヒト組み換え EGF が添加された増殖培地を用いて、5 %CO₂、37 $^{\circ}$ C で静置培養した。70-80%コンフルエントに達した細胞は、培地を吸引した後、Clonetics® Hepes Buffered Saline Solution 2 mL で洗浄した。洗浄液を吸引した後、Clonetics®Trypsin/EDTA 2 mL を添加した。2 分間インキュベートして細胞が剥がれたことを確認した後、トリプシンの反応を停止するために Clonetics®TNS を 2 mL 添加した。細胞用フラスコ内の溶液を回収し、遠心分離した (1000 rpm、5 min) 。遠心分離後の上清をアスピレーターで吸引し、細胞培地 1 mL で細胞を再懸濁させた。細胞懸濁液 150 μ L を新しいディッシュに播種して、継代した。

(3) 細胞毒性試験

RPTEC 細胞を用いて治療候補薬の効果を評価した。

96 well culture plate に RPTEC 細胞 1.0×10^4 cell/well となるように 100 μ L/well 播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 濃度下で 24 時間培養した。培養後、アスピレーターで細胞培地を吸引し、無血清培地を 180 μ L/well 添加した。その後、10 μ L/well の NAC または治療候補薬、10 μ L/well の過酸化水素または造影剤を添加した。コントロール群として無血清培地を 20 μ M を用いた。薬剤を添加後 24 時間の時点で 10%WST-8 溶液 100 μ L/well を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 1 時間インキュベートし、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

WST-8 アッセイで得られる吸光度は生細胞数と比例するため、細胞生存率は以下の式より算出した。

$$(\text{細胞生存率}) = (\text{各薬剤の吸光度} / \text{対照群の吸光度}) \times 100$$

細胞生存率を 50 %程度まで低下させる刺激剤の濃度を検討した。保護剤の効果判定は、細胞生存率を 85 %以上まで上昇させる未知化合物検体を有効と判断した。

(4) 治療候補薬

治療候補薬は-80 $^{\circ}$ C で保管した。これは 96 well プレート上で 10 mM 検体溶液としてあるため、実験前に各濃度の調整を 96 well プレート上で行い、使用時に希釈して用いることとした。希釈法を以下に示す。

10 mM 検体溶液 10 μ L と DMSO 90 μ L を混合し、1 mM 検体溶液を作成した。次に、1 mM 検体溶液 10 μ L と DMSO 90 μ L を混合し、0.1 mM 検体溶液を作成した。これらの 1 mM 検体溶液、0.1 mM 検体溶液を-80 $^{\circ}$ C で保存した。実験日に溶解し、それぞれ 4 μ L と非血清培地 196 μ L を混合し、20 μ M 検体溶液 (DMSO 濃度 2 %) と 2 μ M (DMSO 濃度 2 %) を調製した。調整した 20 μ M 検体溶液、2 μ M 検体溶液を 10 μ L をそれぞれ保護剤として添加し、その効果を評価した。

(5) 統計解析

データは、平均値 ± 標準誤差で示した。n=3 で Tukey 検定を行い、 $p < 0.05$ であるとき、統計学的に有意であると評価した。

4. 研究成果

(1) NAC、DMSO の毒性評価

NAC はコントロール群と比較して 0.1 mM で生存率が有意に増加したが、1 mM では有意な差は見られなかった。そのため、今後の実験では 1 mM の NAC を用いて検討を行うこととした。

DMSO は 0.03 %、0.1 %、0.3 % で濃度依存的な変化を示さず、またコントロール群と比較して有意な差は見られなかった。そのため、今後の実験では 0.1 % の DMSO を用いて検討を行うこととした。

(2) 造影剤及び過酸化水素の濃度検討

造影剤及び過酸化水素が細胞生存率を 50 % まで低下させる濃度を検討した。

造影剤はヨード換算値として 0.01 %、0.1 %、1 %、3.5 % でそれぞれ検討した。造影剤は濃度依存的な殺細胞効果を示さなかった。

過酸化水素は 400 μ M から 500 μ M まで増加傾向を示したものの、そこから減少に転じた。800 μ M で 50 % 以上の殺細胞効果を示したため、今後の実験においては 800 μ M で検討を行なうこととした。しかし過酸化水素 800 μ M を用いて NAC の濃度検討、DMSO との相互作用を検討した実験において、過酸化水素の殺細胞効果が 80% 程度にとどまり、作用が減弱していた。

(3) 低酸素条件下における造影剤及び過酸化水素の濃度検討

造影剤が通常条件では殺細胞効果を示さないことが確認された。また、過酸化水素の効果が減弱していた。そのため、異なったアプローチで濃度検討を行うこととした。

アネロパック・ケンキ®を用いて低酸素状態にし、細胞へのストレスを高めたいうで、造影剤及び過酸化水素が殺細胞効果を示すことができるか検討を行った。

造影剤は 0.1 %、0.2 %、0.5 %、1 % に濃度を振り分けて検討を行った。細胞の生存率は 0.5 % まで上昇傾向を示した。それぞれの濃度においてコントロール群と比較して、有意な減少は見られなかった。また、造影剤への曝露時間を 48 時間に変更して検討を行ったが、濃度依存的な変化は見られなかった。

過酸化水素も同様に低酸素条件にして、殺細胞効果の有無を検討した。低酸素条件では、過酸化水素 400 μ M まで生存率が上昇する傾向を示し、そこから減少に転じた。400 μ M 以降は濃度依存的な減少傾向を示した。600 μ M で約 50 % 程度の細胞生存率の減少が見られた。そのため、今後の検討では 600 μ M の過酸化水素を用いて検討を行うこととした。

(4) NAC 及び DMSO と過酸化水素の相互作用検討

過酸化水素 600 μ M、また再現性が取れなかった場合に備えて同時に 700 μ M も検討した。

NAC 1 mM を用いて、過酸化水素の殺細胞効果が抑制されるか検討した。過酸化水素 600 μ M で

は殺細胞効果が抑制されていたが、700 μM では抑制効果がうまくあらわれなかった。

DMSO と過酸化水素の相互作用を検討した。600 μM では DMSO が殺細胞効果を抑制し、700 μM ではそれが見られなかった。

DMSO の濃度は変更できず、DMSO による細胞保護効果が現れてしまうと治療候補薬による効果の判定ができなくなってしまう。そこで、過酸化水素濃度 700 μM で今後検討していくことにした。NAC が 85%以上の細胞生存率まで回復させる濃度を知るため、さらに検討した。

NAC は 1 mM、2 mM、5 mM、10 mM に調製し、毒性及び過酸化水素の殺細胞効果を抑制するか検討を行った。今回の実験において、保護剤である NAC をより細胞に浸透させるために、NAC 添加後 30 分放置してから、刺激剤である過酸化水素の添加を行った。

NAC は 1, 2, 5 mM で過酸化水素による殺細胞効果を抑制し、細胞の生存率を回復させた。また、NAC の濃度が 1 mM で毒性を示さなかったことから、同濃度で実験を進めることにした。

(5) 予備試験の結果から、DMSO 0.1%濃度で治療候補薬を溶解した。ポジティブコントロールは NAC 1 mM を添加した。治療候補薬は 0.1 M と 1 μM の両濃度を検討した。治療候補薬または NAC を添加後およそ 30 分経過してから、刺激剤として過酸化水素 700 μM を添加した。細胞を刺激剤の添加前後 24 時間低酸素条件に曝露させた。治療候補薬 184 種類について検討を行った。

RPTEC に低酸素条件下、過酸化水素を添加して治療候補薬の評価を行ったところ、殺細胞効果を抑制する化合物は見受けられなかった。しかし過酸化水素の濃度が高い点や、造影剤による検討ではない点などを考慮すると、造影剤による急性腎障害による発症機序を模倣しているとはいえ、異なるアプローチによって結果が変わることも考えられるため、更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐野 元昭 (Sano Motoaki) (30265798)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究分担者	遠山 周吾 (Tohyama Shugo) (90528192)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------