

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790242

研究課題名 (和文) 化学療法剤による腎障害の発現機序解明および予防策の確立に関する研究

研究課題名 (英文) The elucidation of the mechanisms underlying chemotherapeutic agents-induced nephrotoxicity and its precautions.

研究代表者

矢野 貴久 (YANO TAKAHISA)

九州大学・大学病院・技術職員

研究者番号：90532846

研究成果の概要 (和文)：

抗真菌薬であるアムホテリシン B (AmB) や抗 MRSA 薬であるバンコマイシン (VCM) はいずれも、培養腎細胞 LLC-PK1 に濃度および時間依存的な細胞障害を引き起こし、その発現にはミトコンドリア機能異常が関与することが明らかとなった。一方、AmB による腎細胞障害はネクローシスであったが、VCM による腎細胞障害はアポトーシスであり、その発現には活性酸素種が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Both the antifungal agent amphotericin B (AmB) and anti-MRSA drug vancomycin (VCM) caused the mitochondrial dysfunction leading to a concentration- and time-dependent cell injury in cultured renal LLC-PK1 cells. Moreover, ROS generation may play a key role in VCM-induced renal tubular cell apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：化学療法剤、腎障害、ネクローシス、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌薬や抗腫瘍薬といった化学療法剤は、副作用として腎障害を引き起こすことが広く知られており、その頻度は他の薬剤と比べても顕著に高い。しかしながら、多くの薬剤では腎障害発現機序の詳細が依然として不明であり、臨床現場では治療薬物モニタリング (TDM) による血中濃度管理や排泄促進を旨とした輸液療法等が実施されているものの、腎障害への対策は十分とは言えないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、化学療法剤によって引き起こされる腎障害について、発現機序の解明や対策法の確立を目的としており、培養腎細胞を用いて腎障害評価モデルの作製を行い、検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 24 ウェルプレートに播種した培養腎尿管細胞 (LLC-PK1 細胞) に、抗真菌薬アムホテリシン B や抗 MRSA (Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus)薬のバンコマイシンを曝露した際の、用量および時間依存的な細胞生存率の変化を、WST-8法ならびに乳酸デヒドロゲナーゼ(Lactate Dehydrogenase: LDH)の漏出率により評価した。吸光度の測定には96ウェルマイクロプレートリーダーを使用した。

(2)ミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア膜電位感受性色素JC-1を使用して、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて評価を行った。LLC-PK1細胞を8チャンバースライドに $2.0 \times 10^4$  cells/wellにて播種し、24時間後に各薬物を処置した。

(3)ミトコンドリアからのシトクロムC遊離の評価にはcytochrome c release assay kitを使用した。LLC-PK1細胞を8チャンバースライドに $2.0 \times 10^4$  cells/wellにて播種し、24時間後に各薬物処置を行った。ミトコンドリア内のシトクロムCを、特異的な抗体を用いて蛍光染色した後に細胞膜透過処理を行い、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて評価した。

(4)活性酸素(reactive oxygen species:ROS)の検出には、ROS感受性蛍光プローブcarboxy-H2DCF-DAを使用して、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて評価を行った。

(5)アポトーシスの判定には、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling)法を使用し、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて評価を行った。

(6)【統計解析】データは、平均値±標準誤差で示した。2群間の比較にはStudent's t-testを、多重の比較には一元配置分散分析(one-way ANOVA)による解析後、Tukey-Kramer testにより有意差検定を行ない、有意水準は5%とした。

#### 4. 研究成果

(1) LLC-PK1細胞にアムホテリシンBまたはバンコマイシンを処置すると、いずれも濃度ならびに時間依存的に細胞生存率の低下を引き起こした(図1、図2)。

一方、アムホテリシンBまたはバンコマイシンをLLC-PK1細胞に処置した際のLDHの漏出率の変化を測定した結果、アムホテリシンBを24時間処置した群においては濃度依存的なLDH漏出率の上昇が認められたが、バンコマイシンの24時間処置群では、LDH漏出率に顕著な変化は認められなかった(図3)。

(2)バンコマイシンをLLC-PK1細胞に処置し

た際のミトコンドリア膜電位の変化を、ミトコンドリア膜感受性試薬JC-1を用いて評価した結果、バンコマイシンの処置によってミトコンドリアにおけるJC-1の赤色蛍光が減少する一方で、細胞質での緑色蛍光が顕著に増加し、ミトコンドリア膜電位が低下したことが示された(図4A, B)。

加えて、シトクロムCの免疫染色の結果、バンコマイシン処置により、ミトコンドリアにおけるシトクロムCの緑色蛍光が顕著に減少しており、シトクロムCがミトコンドリアから遊離されたことが示された(図4C, D)。

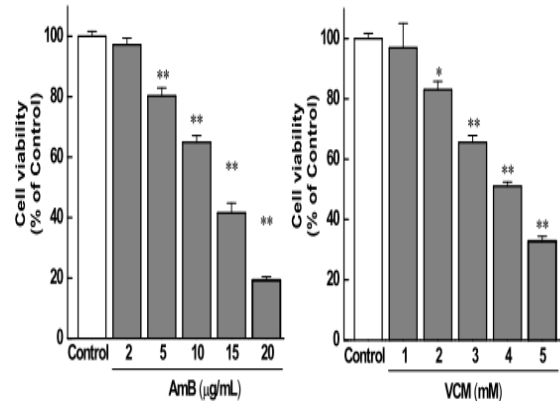


図1 アムホテリシンB(AmB)およびバンコマイシン(VCM)処置による濃度依存的な腎細胞障害各カラムは平均値±SEM(N=4-8)を示す。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control

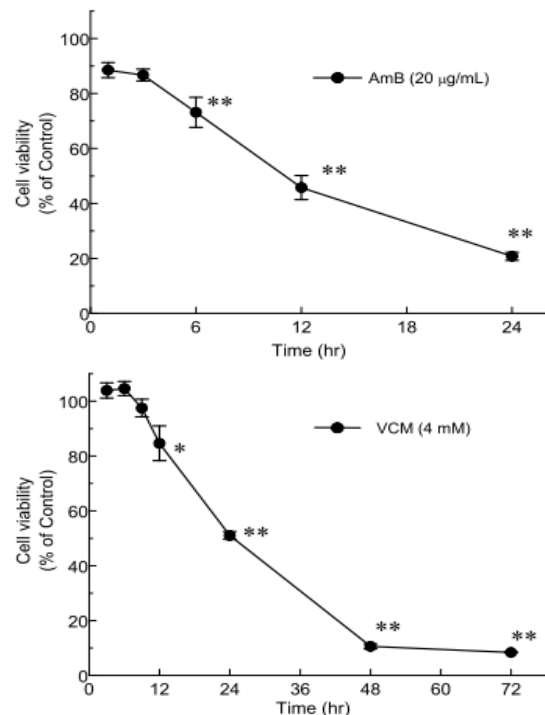


図2 アムホテリシンB(AmB)およびバンコマイシン(VCM)処置による時間依存的な腎細胞障害各プロットは平均値±SEM(N=4-8)を示す。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control

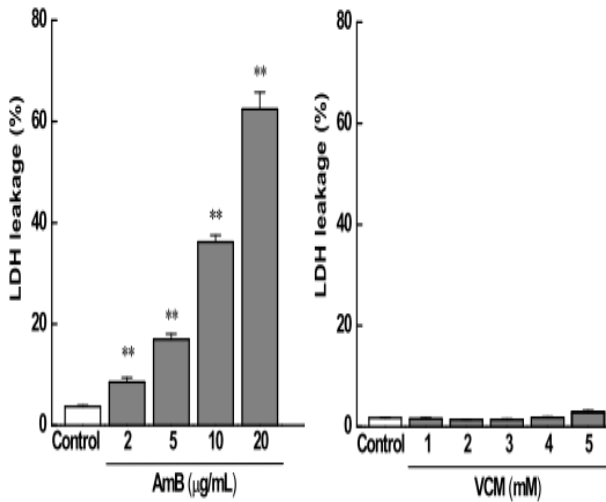


図3 アムホテリシン B (AmB) およびバンコマイシン (VCM) を処置した際の LDH 漏出率の変化  
各カラムは平均値 ± SEM (N=4-8) を示す。  
\*\*P < 0.01 vs control

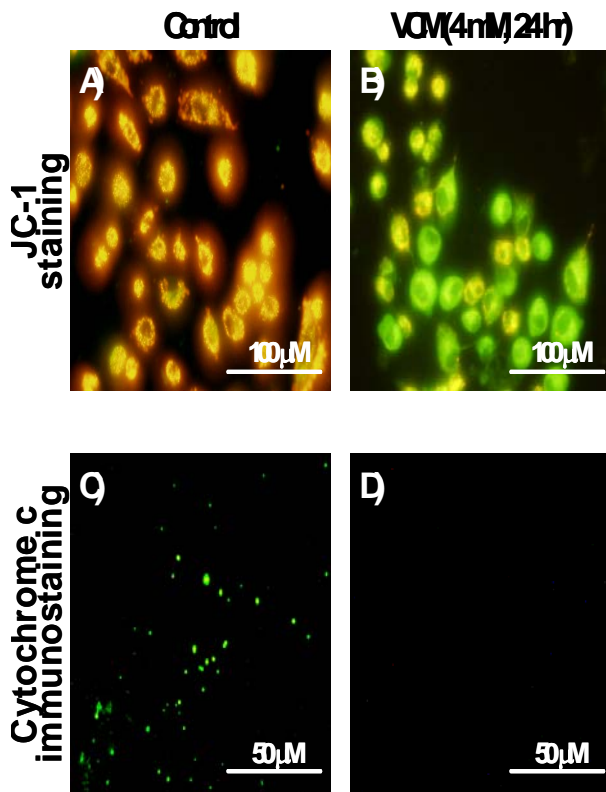


図4 バンコマイシン (VCM) 処置によるミトコンドリア膜電位の低下 (A, B) と、シトクロム C 遊離 (C, D)

(3) バンコマイシンを処置した際の細胞内の ROS 産生量の変化を、ROS 感受性プローブ carboxy-H2DCF-DA により、測定した結果、バンコマイシンの処置後 12 時間および 24 時間において、細胞内の ROS 活性が顕著に増加した (図 5)。

(4) バンコマイシンを処置した際の TUNEL 陽性細胞の変化をフローサイトメトリーにて解析した結果、バンコマイシン処置により TUNEL 陽性細胞が顕著に増加し、アポトーシスが生じていることが明らかとなった。加えて、バンコマイシンによるアポトーシスは、カスパーゼ-3 阻害剤 z-DEVD-FMK ならびにカスパーゼ-9 阻害剤 z-LEHD-FMK の併用により有意に抑制されることが示された (図 6)。

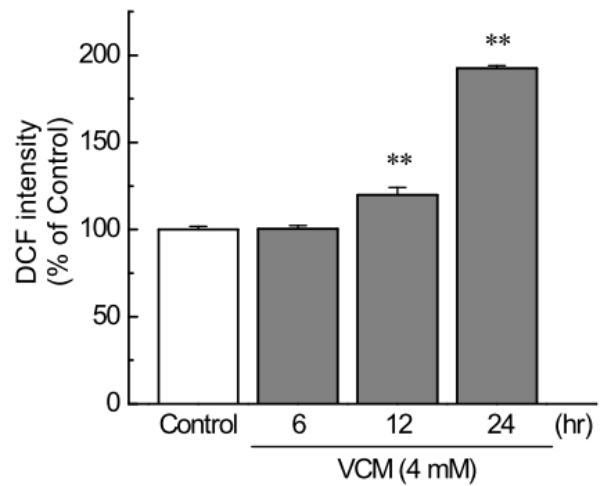


図5 バンコマイシン (VCM) 処置による細胞内 ROS 産生の増加  
各カラムは平均値 ± SEM (N=3-4) を示す。  
\*\*P < 0.01 vs control

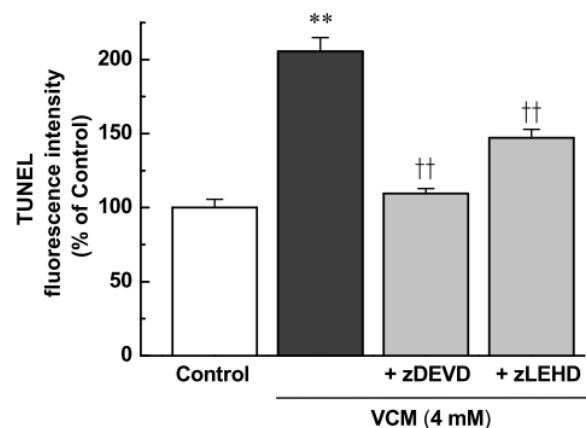


図6 バンコマイシン (VCM) 処置による TUNEL 陽性細胞の増加とカスパーゼ阻害剤の保護効果  
各カラムは平均値 ± SEM (N=4) を示す。  
\*\*P < 0.01 vs control, ††P < 0.01 vs VCM alone.

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

①有村洋平, 矢野貴久, 坂本裕哉, 平野めぐみ, 江頭伸昭, 大石了三.

バンコマイシンによる腎尿細管 LLC-PK1 細胞アポトーシス.

第84回日本薬理学会年会, 平成23年3月22~24日, 横浜(誌上開催)

②有村洋平, 矢野貴久, 坂本裕哉, 平野めぐみ, 江頭伸昭, 大石了三.

バンコマイシンによる腎尿細管細胞障害の発現機序に関する研究.

第63回日本薬理学会西南部会, 第20回日韓薬理合同セミナー(合同開催), 平成22年11月26日, 鹿児島

③ Takahisa Yano, Yoshinori Itoh, Eiko Kawamura, Asuka Maeda, Yohei Arimura, Nobuaki Egashira, Motohiro Nishida, Hitoshi Kurose, Ryoza Oishi, Mechanisms of amphotericin B-induced renal tubular cell injury.

WorldPharma2010 (16<sup>th</sup> IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology), Denmark(Copenhagen), 17-23 July 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 貴久 (YANO TAKAHISA)

九州大学・大学病院・技術職員

研究者番号: 90532846

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: