

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03069

研究課題名（和文）腎組織内薬物分布動態とメタボローム解析を融合したタクロリムス腎症機序解析

研究課題名（英文）Analysis of the pathogenesis of tacrolimus nephropathy by integrating drug distribution kinetics in renal tissue and metabolomic analysis

研究代表者

岩見 大基（Iwami, Daiki）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80581115

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）：腎移植後のタクロリムス（TAC）腎症と、TACとの関係を解析した結果、TAC血中濃度、腎組織内濃度いずれもTAC腎症と有意な関係を認めず、TAC投与年数が影響していた。すなわち腎移植臨床で使用される投与量においてはTAC血中・組織中濃度ではなく投与期間がTAC腎症発症に影響を与えていることが示された。

マウスTAC腎症モデルで腎組織の代謝物解析を行ったところ、ミトコンドリア関連代謝物がTACで低下していた。とくに顕著だったのはミトコンドリア機能維持に重要なカルニチンとその代謝物が低下していた。TAC腎症にはTACによるカルニチン代謝異常を介したミトコンドリア機能低下が関与していると示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により臓器移植後の予後に影響を及ぼしていたTAC腎症発症機序の一部が解明された。本研究の成果を通じて、今まで治療法の存在しなかった臓器移植後のTAC腎症の治療及び予防法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：TAC nephropathy was associated with duration of TAC administration but not blood or intrarenal TAC concentration in the clinical biopsy samples.

In the mouse TAC nephropathy model, metabolome analysis revealed that significant reduction of carnithine, which is associated with maintenance of mitochondria function in the kidney. These results suggested that TAC nephropathy was induced by the dysfunction of mitochondria through reduction of carnithine and its metabolite associated with chronic TAC administration.

研究分野：腎移植

キーワード：タクロリムス 腎症 腎移植 臓器移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎移植成績のさらなる向上のために、免疫抑制薬であるタクロリムス (TAC) による慢性腎障害が大きな障壁となっている。腎臓以外の臓器移植においても (心臓、肺、肝臓、膵臓) TAC は広く使用されている免疫抑制薬であり、それらの臓器移植患者においても自己の腎臓に TAC 腎症が生じ、最終的に腎不全に至るということが問題となっている。従来よりその発症メカニズムは細動脈の硝子様変性とそれに伴う虚血を起因とする腎臓の間質および尿細管の萎縮・線維化とされているが、詳細な病態は十分に解明されていない。それらの機序が詳細に解明されれば、TAC 腎症に対する新たな治療・予防戦略そして臓器移植患者の予後改善に繋がる可能性がある。

これまでの TAC の腎毒性に関する研究としては、臨床データを用いた後方視的な解析によるリスク因子の同定、CYA3A4/5 や P-glycoprotein といった TAC の代謝に関わるタンパクの遺伝子多型と TAC の薬物動態に着目した研究が行われてきたが、TAC 腎症の病態機序解明には至っていない。また、TAC 腎症に対する治療方法として、カルシウム受容体拮抗薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬などを用いた移植腎保護の研究もされてきたが、現在まで有効な結果は得られていない。

### 2. 研究の目的

臨床検体を用いて、腎移植後の TAC 腎症について、TAC 投与状況や他の因子との関係を多変量解析にて明らかにする。また、TAC 腎障害の発症機序を明らかにし新たな治療戦略につなげるために、マウス TAC 腎症モデルを作成し、TAC の腎組織内濃度測定と腎組織の代謝経路のメタボローム解析を行い、その代謝異常を同定し TAC と腎組織内変化の関係を明らかにすることを試みた。

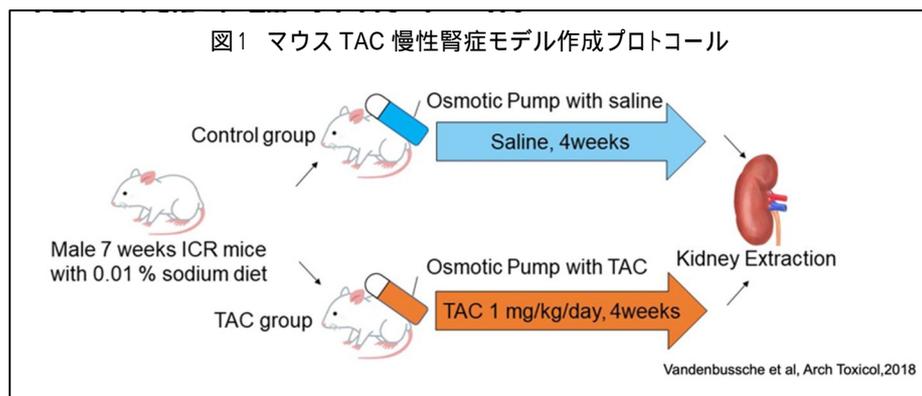
### 3. 研究の方法

#### 【臨床腎生検検体での検討】

当院において腎移植後に移植腎生検を行ったサンプル 94 検体について、タクロリムス (TAC) 慢性腎症 (Banff 分類 aah スコア) の所見について、TAC 投与状況 (ドナー腎提供時年齢、TAC 投与年数、TAC 血中濃度、TAC 腎組織内濃度) との関係を多変量解析にて解析した。

#### 【動物モデルでの検討】

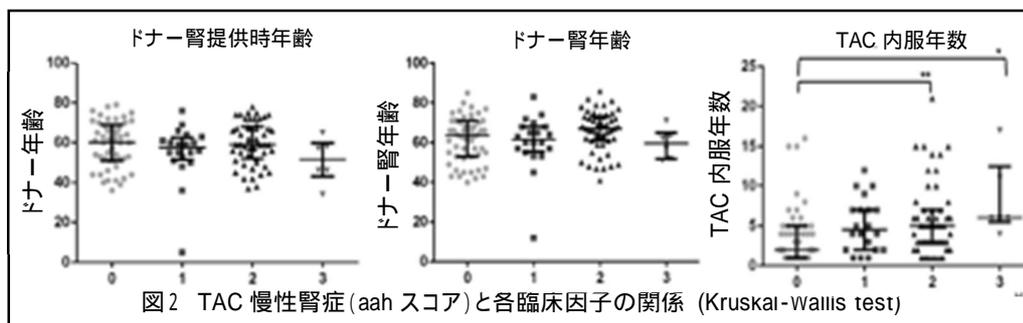
7 週齢 ICR マウスに 0.01% 低 Na 食を経口摂取させながら 1mg/kg/day の TAC を 28 日間皮下投与し、腎組織の病理学的な評価を行った (図 1)。その結果、TAC 投与群は対照群と比べて明らかに線維化領域が増加しており、TAC 腎症が確認された。また、その腎組織をキャピラリー電気泳動 (CE) とフーリエ変換型質量分析計 (FTMS) を組み合わせた CE-FTMS システムにより腎組織の代謝物解析を行った。



### 4. 研究成果

#### 【臨床腎生検検体での検討】

ドナー年齢、TAC 血中濃度 (トラフ値)、TAC 内服後の 24 時間血中濃度曲線下面積 (AUC) のいずれも aah スコアと有意な関係を認めず、TAC 投与年数 (= 移植後年数) が有意に関係していた。また、腎組織内の TAC 濃度については TAC 血中濃度に並行して推移することが確認されたが、組織内濃度もまた TAC 腎症発症に明らかな影響は認めなかった。したがって、腎移植臨床で使用される投与量においては TAC 血中・組織中濃度ではなく慢性的な暴



露期間が TAC 腎症発症に影響を与えていることが強く示唆された。

【動物モデルでの検討】

まず、TAC 投与群では既報どおり 28 日間で腎組織の線維化病変の出現が確認され、各線維化マーカーの亢進を確認した(図3)。

腎組織のメタローム解析を行ったところ、代謝物は 545 種の代謝物(カチオン 305 種、アニオン 240 種)が検出された(図4)。TAC を 4 週間投与したマウスの腎組織内では 65 種類の代謝物で有意な変化が見られ、ミトコンドリア機能に関連する代謝物が TAC 投与群で有意に低下していた。さらにそのうちミトコンドリア機能維持に重要なカルニチンおよびそれに関連する代謝物が最大割合である 27.7% を占めた。カルニチンおよびアシル基が修飾されたアシルカルニチンは TAC 群にて有意に低値であった。

またカルニチン関連代謝物以外での代謝物群としては抗酸化・解糖系・ヒスタミンに関連する代謝物および代謝経路で有意な変化を認めていることが分かった(図5)。

これらの結果より、TAC の投与マウスではカルニチンおよびその代謝物質が腎組織内で低値になっており、カルニチンの機能である酸化促進やミトコンドリア保護作用、抗酸化作用が阻害され尿細管および間質の線維化が生じた可能性が考えられた。これらの研究成果はすでに論文にて出版済みである(Nishida S. et al., Biomedicines 2024, 26, 12(3):521)。

本研究の研究期間中では、そのカルニチン関連物質の変化が TAC 腎症の直接的な原因なのか、あるいは TAC 腎症の結果起きた変化のひとつであったのかは十分に明らかにできなかった。今後は、カルニチンおよび有意に変化した代謝物を標的に、それらの経時的変化に着目することで、各代謝物の変化が TAC 腎症の原因に近い変化であるのか、結果に近い変化であるのか検証し、TAC 腎症の真の病態に近づきたいと考えている。

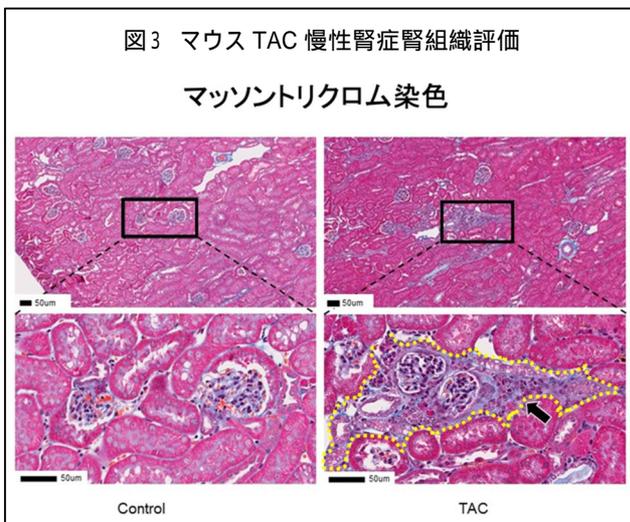


図3 マウス TAC 慢性腎症腎組織評価

マッソントリクロム染色

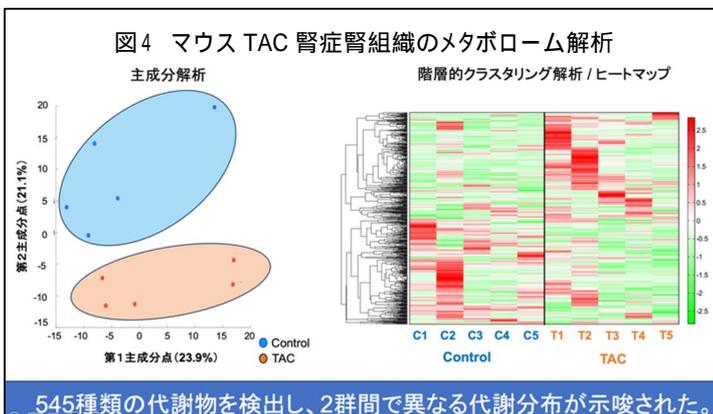


図4 マウス TAC 腎症腎組織のメタローム解析

545種類の代謝物を検出し、2群間で異なる代謝分布が示唆された。

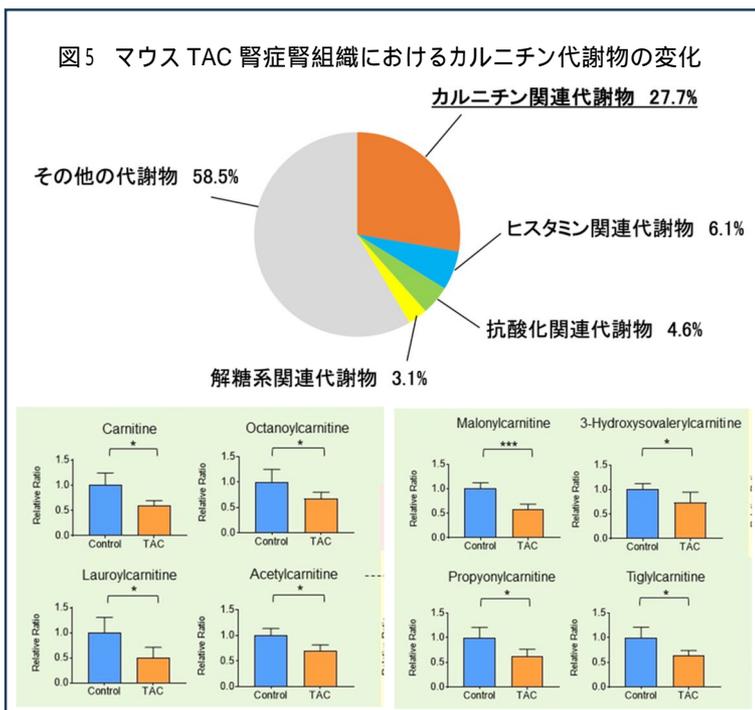


図5 マウス TAC 腎症腎組織におけるカルニチン代謝物の変化

カルニチン関連代謝物 27.7%

その他の代謝物 58.5%

ヒスタミン関連代謝物 6.1%

抗酸化関連代謝物 4.6%

解糖系関連代謝物 3.1%

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishida Sho, Ishima Tamaki, Kimura Natsuka, Iwami Daiki, Nagai Ryoza, Imai Yasushi, Aizawa Kenichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolomic Profiling of Mice with Tacrolimus-Induced Nephrotoxicity: Carnitine Deficiency in Renal Tissue	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 521 ~ 521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines12030521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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	西田 翔 (Nishida Sho) (00909799)	自治医科大学・医学部・助教  (32202)	
研究分担者	佐久間 康成 (Sakuma Yasunaru) (10296105)	自治医科大学・医学部・教授  (32202)	
研究分担者	上田 祐司 (Ueta Hisashi) (10364556)	獨協医科大学・医学部・准教授  (32203)	
研究分担者	南園 京子 (Minamisono Kyoko) (10885586)	自治医科大学・医学部・助教  (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	相澤 健一  (Aizawa Kenichi)  (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授    (32202)	
研究分担者	木下 善隆  (Kinoshita Yoshitaka)  (30856282)	自治医科大学・医学部・助教    (32202)	削除：2021年12月14日
研究分担者	清水 俊洋  (Shimizu Toshihiro)  (40746575)	自治医科大学・医学部・講師    (32202)	削除：2021年12月14日
研究分担者	片野 咲  (Katano Saki)  (20804933)	自治医科大学・医学部・臨床助教    (32202)	追加：2021年12月14日

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