

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590251

研究課題名（和文）シスプラチン腎障害のメカニズム解明とその軽減に向けた薬物療法の創出
 研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism in cisplatin-induced renal failure and development of drug therapy aimed at the mitigation of the renal toxicity of cisplatin.

研究代表者

上田 晴康 (UEDA HARUYASU)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：10330458

研究成果の概要（和文）：シスプラチンは、強力な抗腫瘍効果を有する化学療法剤である。しかしながら、腎毒性も併せ持つために、しばしば投薬中止となるケースもある。そこで、シスプラチンの腎毒性発現に関わるメカニズムを解明し、それを改善する薬剤と併用することでシスプラチンの抗がん作用を邪魔することなく腎毒性を抑えることができるのではないかと考えた。本研究により、我々は、シスプラチンがキマーゼを介したインターロイキン（IL）-18 の産生促進によりアルドステロンの産生を誘導することでシスプラチンの腎排泄を延長させるために腎炎が発症するという新しいメカニズムを提唱した。従って、キマーゼ阻害剤やアルドステロン受容体拮抗薬をシスプラチンと併用することによって、シスプラチン腎炎の発症を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cisplatin is a chemotherapeutic agent having a potent anti-tumor effect. However, in some cases, cisplatin has often withdrawn due to renal toxicity. Therefore, we tried to elucidate mechanisms involved in renal toxicity of cisplatin, and find out therapy to improve it, and thus, it might be able to reduce the nephrotoxicity without disturbing the anticancer effect of cisplatin by combination with drugs to elucidate mechanisms involved in renal toxicity of cisplatin. In the present research, we have proposed a novel mechanism(s) on the development of cisplatin-induced renal failure that cisplatin accelerates chymase-dependent production of IL-18 which stimulates aldosterone synthesis, and that extended excretion of cisplatin causes renal inflammation. Thus, concomitant use of inhibitor(s) of chymase activity or aldosteron binding to its receptor with cisplatin could be reducing the pathogenesis of renal damage by cisplatin therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：炎症・免疫、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

シスプラチンは、強力な抗腫瘍作用を有するプラチナ製剤であり、その臨床使用において、

腎障害を頻出するために投薬を中断せざるを得ないケースも多々ある。しかし、本薬剤はがん治療には有益な薬剤であるため、腎障

害の軽微な誘導体開発もされている。マウスにシスプラチンを腹腔内投与すると、投与後2日目頃より血液尿素窒素やクレアチニンといった腎障害のマーカーが著しく高値となり、腎障害を呈するようになる。我々は、このようにして作成した腎障害モデルマウスにおいて、シスプラチン投与1日目より血中IL-18レベルが著しく上昇していることを見出した。一方、IL-18遺伝子欠損マウスではシスプラチン投与による血液尿素窒素やクレアチニンの上昇が起こらず、腎障害とならなかったことから、IL-18は本病態モデルでは増悪因子として働いていることが考えられた。そこで、IL-18がどのような機序で本病態モデルに関与しているのかについて解明することを目的とした研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、シスプラチン腎炎におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化とIL-18の関わりに着目した研究を行い、本疾患の生物学的メカニズムを解明すると共に、シスプラチン腎炎の増悪に深く関与していると思われる因子の阻害剤を用いた検討を行い、シスプラチン腎炎を軽減する薬物療法を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

9~10週齢の野生型雄性BALB/cおよびIL-18遺伝子欠損マウスを用いた。これらのマウスは室温24±2°Cで湿度コントロールされた飼育室において飼育され、水および食餌を自由摂取させた。実験動物の使用については、動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

(2) 使用薬剤

シスプラチンとPD123319(AT2受容体遮断薬)は米国Sigma社より購入した。カンデサルタンおよびソムノペンチルはそれぞれ米国LKT社および共立製薬より購入した。リコンビナントマウスIL-18およびエプレレノン、ベナゼプリルはそれぞれ米国グラクソ社および米国ファイザー社、瑞西ノバルティス社より提供を受けた。TY-51469(キマーゼ阻害剤)は東亜栄養株式会社より提供を受けた。

(3) シスプラチン腎炎の誘導

シスプラチンを加温した生理食塩水に溶解して1 mg/mlの溶液を作成した。これを20 mg/kgとなるようにマウスの腹腔内に単回投与して、急性腎炎を誘導した。

(4) 各種薬剤の処置

シスプラチン投与30分前および投与1日後、2日後の3回に渡り、0.5%カルボキシメチル水溶液に溶解したエプレレノン(10 mg/kg)を経口投与した。また、同じ投与スケジュールで0.5%カルボキシメチル水溶液に溶解したベナゼプリル(10 mg/kg)あるいはカンデサルタン(1 mg/kg)、リン酸緩衝生理食塩水

に溶解したPD123319(5 mg/kg)またはTY-51469(1 mg/kg)を腹腔内投与した。リコンビナントIL-18は0.5%正常マウス血清を含むリン酸緩衝液で希釈したものを腹腔内投与した(100 μg/kg)。尚、正常コントロールマウスには各種薬剤の溶解に用いた溶液を投与した。

(5) サンプルの採取と各種因子の血清レベルの測定

シスプラチン投与マウスおよびコントロールマウスはソムノペンチル(50 mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔をかけた上で、腹部を切開し、腹部大静脈より採血を行った。採取した血液は、速やかに遠心分離により血清を分離し、尿素窒素およびクレアチニン量はオートアナライザー(HITACHI 7180)を用いて測定した。血清アルドステロンレベルは市販のラジオイムノアッセイキットを、IL-18およびその他のサイトカイン、また、アンジオテンシンIIレベルは市販のELISAキットを用いて定量した。

(6) 腎シスプラチン含量の測定

血液を採取した後にマウスから腎臓を摘出した。腎臓はホモジネートとした後に凍結乾燥し、濃硝酸と過酸化水素水を加え、サンドバスを用いて加熱乾固後、再度濃硝酸に溶解し、塩酸で希釈したものを原子吸光光度計(日立偏光ゼーマン原子吸光光度計Z-5000)を用いフレームレス法(高温炭素炉法)により測定し、腎単位組織あたりのプラチナ含量を測定した。

(7) 統計処理

実験データの統計解析はPrism 5を用いて行い、統計分析は分散分析の後、Dunnettの多重比較、Bonferroniの多重分析により行い、P値が0.05以下の場合に有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) シスプラチン投与後によりマウスの血清中で上昇を認めた因子

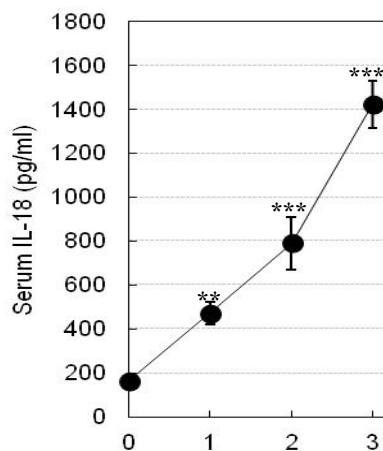


図1. シスプラチン投与後(日)の血清IL-18レベルの変動

シスプラチン投与 1 日目の血清において有意な IL-18 レベルの上昇を認め、シスプラチン投与 3 日目まで経時的に増加することがわかった (図 1)。

IL-18 以外にも TNF α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-10 および MIP-1 α などのサイトカインについても測定したが、これらは検出できなかった (データ省略)。

シスプラチン投与による血清中の IL-18 レベルの上昇と相関するようにシスプラチン投与 2 日目以降のマウスの血清において有意なアルドステロン (図 2 左) およびアンギオテンシン II (図 2 右) の上昇を認めた。

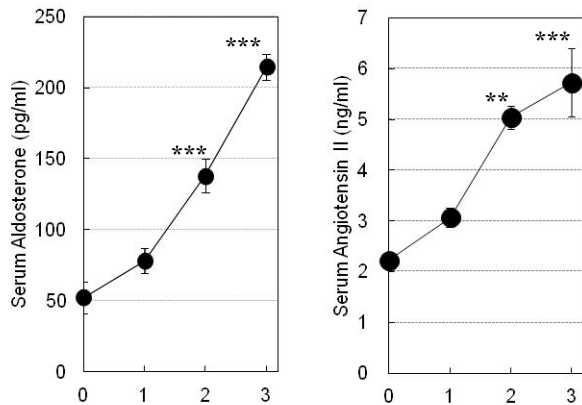


図 2. シスプラチン投与後 (日) の血清アルドステロンレベル (左) およびアンギオテンシン II (右) の変動

(2)シスプラチン腎炎における IL-18 の役割
シスプラチン腎炎において IL-18 がどのような役割を果たしているかを検討するため、IL-18 遺伝子欠損マウスにシスプラチンを投与し、経日的変化を野生型マウスと比較した。野生型マウスはシスプラチン (20mg/kg) 投与後、経日的に死亡例が増加し、投与 3 日目には約 30%のマウスが生存するのみであったが、IL-18 遺伝子欠損マウスでは、同用量のシスプラチンによって投与 2 日目までは死亡例はなく、投与 3 日目でも 90%以上が生存する結果となった (図 3)。

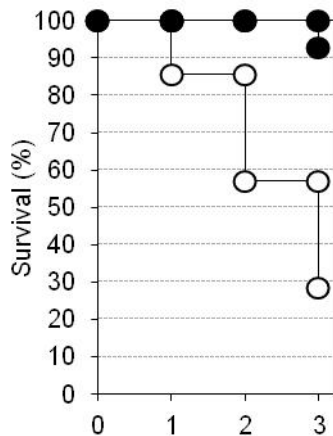


図 3. 野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウス (IL-18KO) におけるシスプラチン投与後のマウスの死亡率の経日変化
○野生型マウス、●IL-18 遺伝子欠損マウス

また、野生型マウスにシスプラチン (20mg/kg) を投与した場合、投与 2 日目において腎障害の指標である血清尿素窒素値およびクレアチニン値のいずれにおいても有意な上昇を認めたが、IL-18 遺伝子欠損マウスではシスプラチン投与によるそれらの上昇を認めなかった (図 4)。

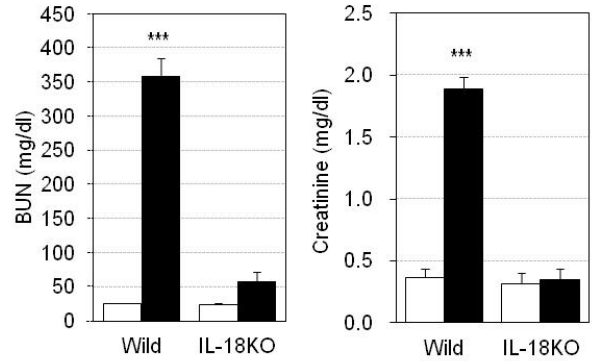


図 4. 野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウス (IL-18KO) におけるシスプラチン投与 2 日目の血液尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン値の比較
□コントロール、■シスプラチン投与

以上のように、IL-18 遺伝子欠損マウスはシスプラチンの腎毒性に対して抵抗性であったことから、IL-18 がシスプラチン腎炎の増悪因子として働いていることが推測された。

(3)シスプラチンの蓄積と IL-18
シスプラチンは腎臓に蓄積して活性酸素分子種の発現を増強することで腎毒性を示すことが報告されていることから、野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウスにおけるシスプラチン投与後の腎臓を用いてシスプラチン含量の推移について調べたところ、シスプラチン投与 2 日目以降、IL-18 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて、腎臓におけるシスプラチンの蓄積が有意に少ないことがわかった (図 5)。

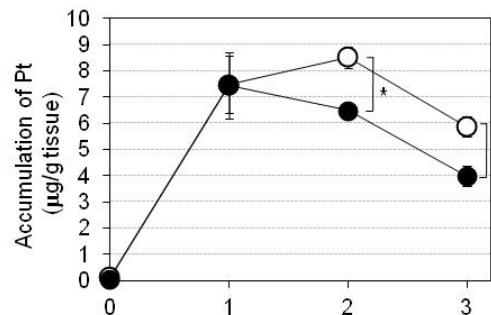


図 5. 野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウスにおけるシスプラチン投与後の腎臓のシスプラチン含量の経日変化
○野生型マウス、●IL-18 遺伝子欠損マウス

(4) シスプラチン腎炎に関わるその他の因子と IL-18 の関連

野生型マウスにシスプラチンを投与した際には IL-18 以外にもアルドステロンやアンギオテンシン II が血中で有意に上昇したことから、これらの因子と IL-18 の関連を調べるため、IL-18 欠損マウスを用いて、シスプラチン投与後のアンギオテンシン II およびアルドステロンレベルについて検討した。シスプラチン (20mg/kg) を投与後 2 日目の血清中アンギオテンシン II レベルは野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウスのいずれにおいても変化なかった (図 6 左)。一方、アルドステロンレベルは IL-18 遺伝子欠損マウスでは上昇しなかった (図 6 右)。

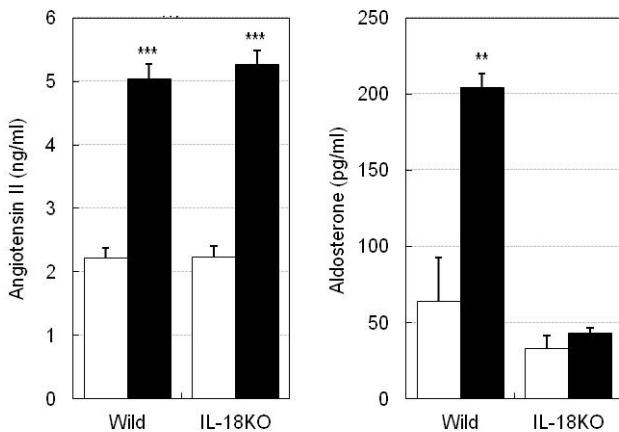


図 6. 野生型マウスおよび IL-18 遺伝子欠損マウス (IL-18KO) におけるシスプラチン投与 2 日後のマウス血清中アンギオテンシン II (左) およびアルドステロンレベル (右) の比較
□コントロール、■シスプラチン投与

この結果より、IL-18 はシスプラチン投与後のアンギオテンシン II の産生には関連しないが、アルドステロンの産生には関与することが示唆された。そこで、野生型マウスにリコンビナントマウス IL-18 を投与することによってアルドステロンの産生が誘導されるかについて調べた。リコンビナント IL-18 を野生型マウスに投与した 2 日後に血液を採取し、血中アルドステロン値を測定すると、マウス IL-18 の用量に依存して血中アルドステロンレベルが上昇する結果となった (図 7 左)。また、マウス IL-18 (100 μg/kg) を投与後経日的にアルドステロンの産生量を測定すると、投与 2 日目以降にピークとなることがわかった (図 7 右)。

このことから、IL-18 は直接的にアルドステロンを誘導することが判明した。近年アルドステロンは炎症メディエーターの一つと考えられており、アルドステロンレベルの上昇により炎症が引き起こされることも考えられるが、IL-18 を単独で投与した場合、アル

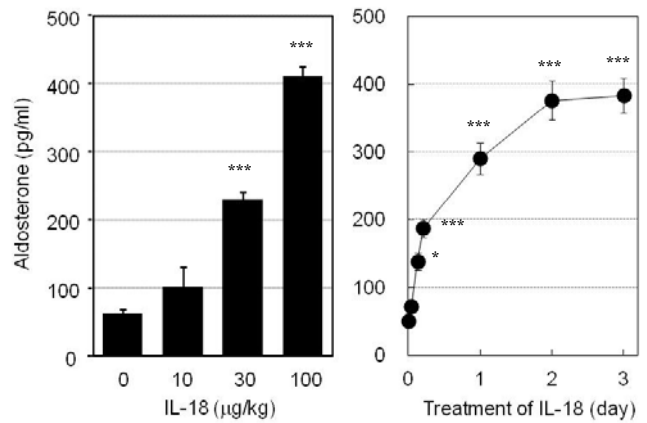


図 7. リコンビナントマウス IL-18 の投与による血中アルドステロンレベルの変動
用量依存性 (左)、時間依存性 (右)

ドステロン値は上昇するが、腎炎のマーカーである血液尿素窒素やクレアチニンレベルが上昇することはなかった (データ省略)。このことは、IL-18 やアルドステロンそのものが腎炎を引き起こしているのではなく、シスプラチンによって引き起こされる腎炎のメディエーターとして介在していることを示している。この推論を確かめるために、IL-18 遺伝子欠損マウスにリコンビナントマウス IL-18 を投与し、その後シスプラチンを投与した場合、野生型マウスと同様に腎炎が起こるかどうか検証した。

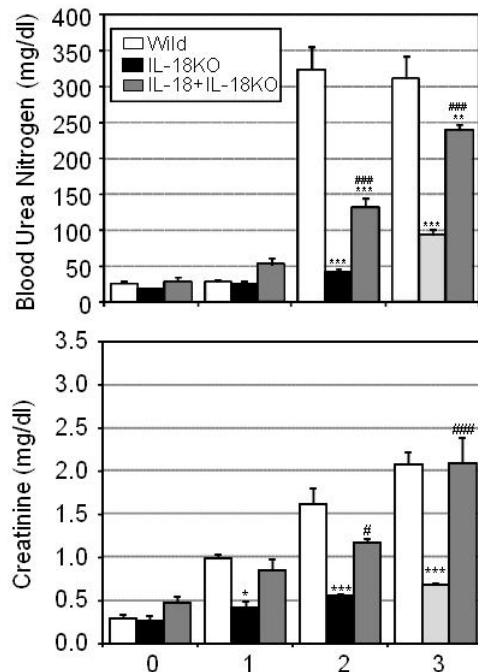


図 8. リコンビナントマウス IL-18 投与 IL-18 遺伝子欠損マウスにおけるシスプラチン投与による血液尿素窒素およびクレアチニンレベルの経日変化
血液尿素窒素 (上)、クレアチニン (下)

あらかじめリコンビナントマウス IL-18 (100 μ g/kg) を IL-18 遺伝子欠損マウスに投与しておいてからシスプラチンを投与して2日目の血液中の腎炎のマーカである血液尿素窒素およびクレアチニン値を測定すると、野生型マウスと同様に腎炎のマーカの上昇を認めた (図8)。以上のことから、IL-18 はアルドステロンの産生を誘導することでシスプラチン腎炎にメディエーターとして関与していることが明らかとなった。

(5) シスプラチン腎炎のメカニズム

アルドステロンは尿細管においてナトリウムイオンの貯留を促進することで水分の保持に関わる因子であり、シスプラチン腎炎においては腎臓からのシスプラチンの排泄を抑制し、シスプラチン腎炎を促進すると考えられる。アルドステロンはレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系と称されるメカニズムによって産生されることが広く認められている。今回、本研究においてシスプラチン投与後に血中アンギオテンシンIIレベルの上昇することを見出しているが、IL-18 遺伝子欠損マウスにおける検討から、アンギオテンシンIIはシスプラチン投与後のアルドステロン産生に関わっておらず、IL-18 が直接アルドステロンを産生することが明らかとなった。では、アンギオテンシンIIはシスプラチン腎炎においてどのような役割を担っているのであろうか？

また、IL-18 はカスパーゼ1による IL-18 前駆体の切断により産生するメカニズムに加え、近年、キマーゼによる IL-18 前駆体の切断によって産生されるメカニズムも報告されている。さらに、アンギオテンシンIIは、アンギオテンシン転換酵素 (ACE) によるメカニズムに加え、局所での炎症に関わるアンギオテンシンIIの産生は炎症組織に存在するキマーゼによる産生メカニズムも知られており、組織障害との関連においてはキマーゼを介する経路に特に注目が集まっている。では、シスプラチンによるアンギオテンシンIIおよび IL-18 の産生誘導のメカニズムはどうなっているのであろうか？

これらの疑問を解決するために、アンギオテンシンIIまたは IL-18 の産生に関わっている ACE やキマーゼを阻害する薬剤、そして、シスプラチンの腎臓への貯留を促進するアルドステロン受容体を阻害する薬剤を用いた検討を行った。また、シスプラチン腎炎におけるアンギオテンシンIIの役割を調べるために、アンギオテンシンII受容体拮抗薬を用いた検討を行った。これらの薬剤のうち、シスプラチン腎炎を軽減することにおいて有効なものは、シスプラチンの副作用を軽減させる目的で、シスプラチンを用いたがん治療に併用薬として利用することも可能である

と考えられる。

そこで、シスプラチン投与に先立ち、ACE 阻害剤であるベナゼプリル、アンギオテンシンII受容体拮抗薬であるカンデサルタン (選択的 AT1 受容体拮抗薬) および PD123319 (選択的 AT2 受容体拮抗薬)、アルドステロン受容体拮抗薬であるエプレレノン、そしてキマーゼ阻害薬である TY-51469 を前処置した野生型マウスを用いて、シスプラチン投与による腎炎マーカの上昇に対する効果を指標に、これらの薬剤の効果について検討した。

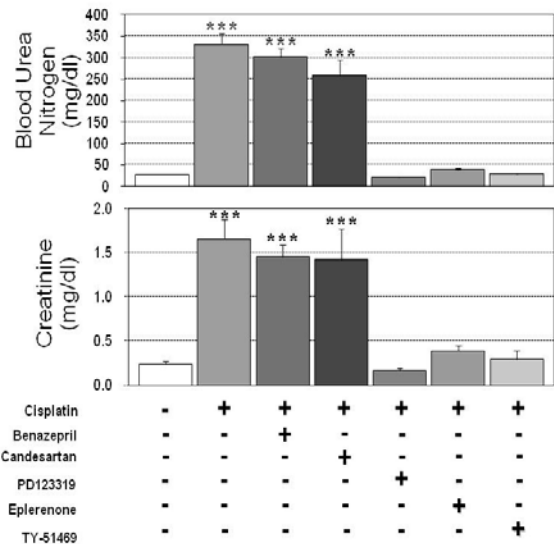


図9. 各種阻害剤によるシスプラチン投与後の腎障害パラメーターに対する影響
血液尿素窒素 (上)、クレアチニン (下)

マウスにシスプラチンを投与して48時間後には腎炎マーカである血液尿素窒素およびクレアチニン値が著明に上昇し、シスプラチン腎炎の発現していることを示している。シスプラチン投与の1時間前および投与24、48時間後の3回に渡りACE阻害剤ベナゼプリルおよび選択的AT1受容体拮抗薬カンデサルタンを腹腔内処置しておいたマウスの場合、血液尿素窒素およびクレアチニン値は低下を示しておらず、シスプラチン腎炎の発現にACEおよびAT1受容体は関与していないことが考えられた。一方、キマーゼ阻害剤TY-51469およびアルドステロン受容体拮抗薬エプレレノンを先の阻害剤と同様な方法で処置しておいたマウスの場合、血液尿素窒素およびクレアチニン値はシスプラチン投与によっても上昇していなかったことから、シスプラチン腎炎の発症にはキマーゼおよびアルドステロンの関与していることが明らかに示された。また、選択的AT2受容体拮抗薬PD123319を処置したマウスの場合でも血液尿素窒素およびクレアチニン値は低下したことから、アンギオテンシンIIはAT2受容体を介するメカニズムでシスプラチン腎炎に関与することが示唆された (図9)。この

結果から、シスプラチンはキマーゼを活性化することによって IL-18 の産生を誘導し、産生された IL-18 はレニン-アンジオテンシン系を介さず、直接的にアルドステロンの産生を刺激することが想定された。

この考えを確かめるために、シスプラチン投与に先立ち、各種阻害剤を処置しておき、シスプラチンによるアルドステロンの産生誘導に対して各種阻害剤がどのような影響をおよぼすのかについて調べた。尚、各種阻害剤の投与は先の実験と同様に行った。

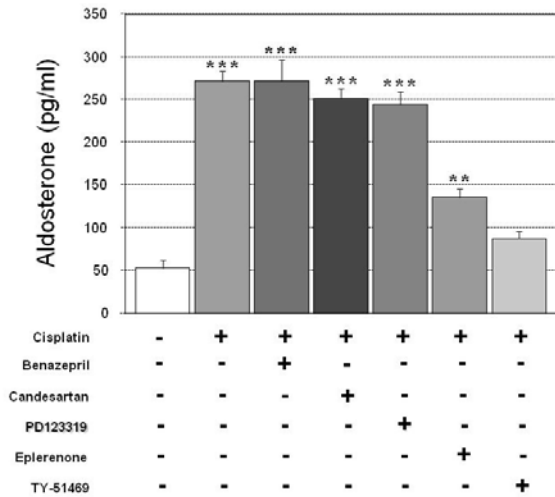


図 10. 各種阻害剤によるシスプラチン投与後の血清中アルドステロンレベルに対する影響

マウスにシスプラチンを投与して 48 時間後に血清中のアルドステロンレベルは著明に上昇したが、シスプラチン投与の 1 時間前および投与 24、48 時間後の 3 回に渡り ACE 阻害剤ベナゼプリルおよび選択的 AT1 受容体拮抗薬カンデサルタンを腹腔内処置しておいたマウスの場合、血液尿素窒素およびクレアチニン値と同様に血清中アルドステロンレベルは低下を示しておらず、シスプラチンによるアルドステロンの産生誘導に ACE および AT1 受容体は関与していないことが示された。一方、先の阻害剤と同様な方法でキマーゼ阻害剤 TY-51469 を処置しておいたマウスの場合、血清アルドステロンレベルはシスプラチン投与によっても上昇していなかったことから、シスプラチンによるアルドステロンの産生誘導にはキマーゼの関与していることが明らかとなった。また、アルドステロン受容体拮抗薬エプレレノン処置しておいたマウスの場合、シスプラチン投与による血清アルドステロンレベルの上昇は部分的に抑制されたことから、シスプラチンによるアルドステロンの産生誘導にはアルドステロン受容体を介したオートクリン機構も関与していることが考えられた。また、選択的 AT2 受容体拮抗薬 PD123319 を処置したマウスの

場合では血液尿素窒素およびクレアチニン値の結果とは異なり、シスプラチンによる血清中アルドステロンレベルの上昇は抑制されなかったことから、AT2 受容体は、アルドステロンの産生誘導とは異なるメカニズムを介してシスプラチン腎炎に関与することが示唆された (図 10)。

以上の結果を統合すると図 11 に示すようなメカニズムが考えられた。

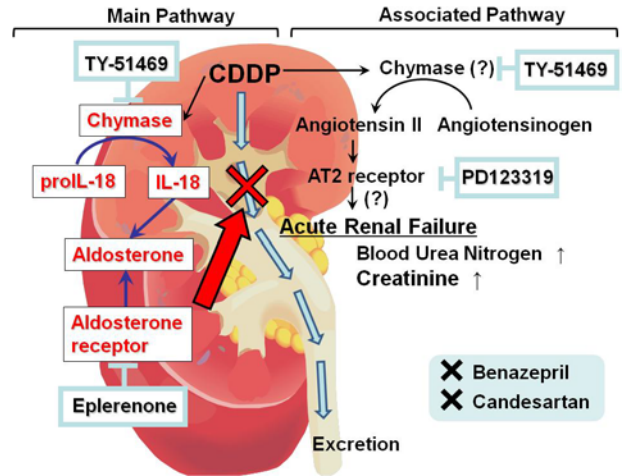


図 11. 提唱されるシスプラチン腎炎のメカニズム (模式図)

シスプラチンは、キマーゼを活性化することで IL-18 の産生を促進し、IL-18 による直接的なアルドステロンの産生を誘導する。産生されたアルドステロンはアルドステロン受容体に作用し、ナトリウムの再吸収を促進する結果、腎臓でのシスプラチンの貯留時間を延長する結果、シスプラチン腎炎を引き起こす。IL-18KO マウスおよびキマーゼ阻害剤やアルドステロン受容体拮抗薬を用いた検討から、この経路がシスプラチン腎炎発症の主たる経路であると考えられる。一方で、シスプラチンによって活性化されたキマーゼはアンジオテンシン II の産生をも促進し、産生されたアンジオテンシン II は AT2 受容体を介するメカニズムでシスプラチン腎炎に関わる。選択的 AT2 受容体拮抗薬を用いた検討では、シスプラチンによるアルドステロンレベルの上昇には影響せず、腎炎マーカーの上昇を抑制したことから、AT2 受容体を介するメカニズムはアルドステロンによるシスプラチンの貯留延長ではなく、その後の炎症のメカニズムに関わっているのではないかと推測している。

(6) まとめ

本研究により、シスプラチン腎炎の発症に関わる新たな因子としてキマーゼ、IL-18、アルドステロンを見出し、これらの連関によりシスプラチンの副作用発現のメカニズムが

明らかとなったことは、シスプラチンの副作用を低減させる新たな薬物治療の可能性を示す意義があると思われる。すなわち、キマーゼあるいはアルドステロン受容体拮抗薬をシスプラチンと併用することにより、シスプラチンの重大な副作用である腎炎を抑制出来るものと考えられる。また、腎臓におけるAT2受容体はこれまで何の役割を果たしているか定かではなかったが、本研究によりシスプラチン腎炎の増悪に関わっていることが推測された。詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要であると思われるが、すでに開発されている選択的AT2受容体拮抗薬の新たな有用性を示す結果であると考えられた。

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)

Okui, S., Yamamoto, H., Li, W., Gamachi, N., Fujita, Y., Kashiwamura, S., Miura, D., Takai, S., Miyazaki, M., Urade, M., Okamura, H., Ueda, H.

Cisplatin-induced acute renal failure in mice is mediated by chymase-activated angiotensin-aldosterone system and interleukin-18

Eur. J. Pharmacol., 査読有、685, 149-155 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 晴康 (UEDA HARUYASU)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：10330458

(2) 研究分担者

田中 稔之 (TANAKA TOSHIYUKI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30217054

大野 喜也 (OONO YOSHIYA)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：40509155