

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790246

研究課題名(和文) プロスタノイドの急性腎不全病態形成における役割解明

研究課題名(英文) Role of the prostanoid in cisplatin-induced nephropathy

研究代表者

小島 史章 (Kojima, Fumiaki)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30550545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シスプラチン誘発急性腎不全モデルとプロスタグランジンE2(PGE2)受容体のEP1を欠損するマウスを用いて、急性腎不全の病態形成におけるPGE2-EP1系の役割について検討した。EP1欠損マウスでは野生型のマウスと比較して、シスプラチン投与後の生存率が著明に改善されることを見出した。また、EP1欠損マウスにおいて、シスプラチン投与の72時間後における腎機能障害の程度が有意に軽減されることが明らかになった。さらに、EP1欠損マウスの腎臓における炎症性サイトカインの産生と酸化ストレスの軽減が確認された。以上の結果より、急性腎不全の病態形成においてPGE2-EP1系が増悪に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of the EP1 receptor (a prostaglandin (PG) E2 receptor subtype) in the cisplatin-induced acute kidney injury using EP1 knock-out (KO) mice. Three days following cisplatin injection, nephrotoxicity biomarkers including plasma creatinine, blood urea nitrogen (BUN) and kidney injury molecule-1 (Kim-1) were significantly increased in wild-type (WT) mice, while these changes were diminished in EP1 KO mice. Histopathological analyses further showed a significant reduction in structural damages in EP1 KO kidney compared to WT kidney after cisplatin injection. In addition, the improvements of functional and structural abnormalities consistent with nephrotoxicity observed in EP1 KO mice were associated with significantly lower levels of renal inflammatory cytokine expression and oxidative stress. These results indicate that PGE2-EP1 system plays a crucial role in cisplatin-induced nephrotoxicity.

研究分野：薬理学

キーワード：プロスタノイド

1. 研究開始当初の背景

急性腎不全は、様々な疾患に併発する重篤な病態のひとつである。その発症率は入院患者で5%、ICU入院患者で20%程度であり、その頻度は決して低くない (Am. Fam. Physician. 72: 1739-46, 2005)。また、我国では本病態を呈する重篤入院患者の死亡率が50%を超えること (JAMA. 294, 813-5, 2005) や生存患者の中でも長期的な透析治療を必要とする患者数が増加の一途をたどる現状にあること (Curr. Opin. Crit. Care. 9: 491-5, 2003) など、予後の不良と医療費の増大が社会的に問題視されている。したがって、本疾患の病態形成機構の解明や適切で安全な治療法の確立は急務といえる。急性腎不全の基礎研究では、実際にこの病態を惹起する原因に即し、虚血性、重金属性、薬物性などの急性腎不全モデル動物を用いた解析が行われている。その中でも、臨床の場で様々な癌治療に用いられている抗がん剤シスプラチンによって誘発される急性腎不全の動物モデルは、腎不全病態解明のために汎用されている。

プロスタノイドのひとつであるプロスタグランジン (PG) E_2 は、標的細胞に存在する4種類の特異的受容体 (EP_1 、 EP_2 、 EP_3 、 EP_4) を介し、多彩な作用を発揮する生理活性脂質である (Physiol Rev. 79: 1193-226, 1999)。急性腎不全においては、腎臓での PGE_2 の過剰産生が認められており、その病態形成におけるプロスタノイドの役割が注目されている。しかし、腎臓に高発現するプロスタノイド受容体の本病態形成における役割については、これまで十分に検討されていないのが現状である。そこで申請者は、 PGE_2 - EP_1 系の急性腎障害時における役割とその作用機序の解明を目指すとともに、プロスタノイド受容体を標的とする新たな急性腎不全治療の可能性を模索し、臨床応用へと発展するための研究基盤を確立することを最終目標として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、 PGE_2 - EP_1 系が急性腎不全の病態形成においてどのようなメカニズムにより増悪因子として働くのかを解明することにある。具体的には、急性腎不全病態モデルにおける EP_1 欠損マウスと野生型マウスの表現形を比較することで、腎不全病態の形成過程における PGE_2 - EP_1 系の標的因子を同定し、その作用発現の機構を明らかにする。また、急性腎不全病態において PGE_2 - EP_1 系の標的となる腎障害関連因子の動態を解析し、尿細管障害のメカニズムを明らかにする。さらに、 EP_1 特異的拮抗薬の作用を検討することで、 EP_1 標的薬物の腎不全治療薬としての可能性を検証し、臨床応用へと発展するための研究基盤を確立することを最終目標としてい

る。

3. 研究の方法

EP_1 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、急性腎不全の病態を反映するシスプラチン誘発急性腎不全モデルを対象とした解析を行う。具体的には、シスプラチン (20 mg/kg) を EP_1 欠損マウスおよび野生型マウスの腹腔内に投与し、24、48、72時間後の腎障害の程度を経時的に比較検討する。腎機能障害の程度は、尿量や飲水量の測定に加えて、血清クレアチニンや血液尿素窒素の測定することで評価する。また、摘出腎を標本として、 PGE_2 産生酵素群 (COX および PGE 合成酵素) と EP_1 の発現動態を経時的に解析する。さらに、腎障害の一因となる炎症性サイトカインなどの炎症関連因子の動態と酸化的ストレスについて検討する。これらの解析により、 PGE_2 - EP_1 系が急性腎不全の病態形成にどのように関与しているかを評価した。また、シスプラチン誘発急性腎不全の病態に対する EP_1 拮抗薬の効果を検討する。

4. 研究成果

シスプラチン (20 mg/kg) を野生型マウスの腹腔内に投与し、24、48、72時間後の血清クレアチニンと血液尿素窒素を測定することで、腎機能障害の程度を経時的に評価した。その結果、血清クレアチニンと血液尿素窒素は共に、シスプラチン投与の24時間後より増加しはじめ、その後さらに時間依存的に増加し、48時間後および72時間後には対照群に比べて有意な増加を示した。この結果は、摘出腎の切片標本を用いて腎組織病変の変化を病理学的に解析した結果と相関していた。また、シスプラチン投与群では、腎臓における尿細管障害のマーカー分子のひとつである kidney injury molecule-1 (Kim-1) の発現の著明な増加を認めた。

シスプラチン投与後の摘出腎を標本として、 PGE_2 の産生に必須なシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) の発現と、COX の下流で PGE_2 の産生に特異的に働く膜型 PGE 合成酵素-1 (microsomal PGE_2 synthase-1: mPGES-1) の発現動態をリアルタイム RT-PCR 法にて経時的に解析した。その結果、COX のアイソザイムのひとつである COX-2 と mPGES-1 の mRNA 発現は共に、シスプラチン投与24時間後より対照群と比較して有意に増加しはじめ、その発現の増加は48時間後および72時間後にプラトーとなった。一方、COX-1 の発現については、シスプラチン投与群と対照群の間で差を認めなかった。したがって、COX-2 と mPGES-1 の発現の誘導が、シスプラチンによって誘発される急性腎不全の病態形成過程における PGE_2 の過剰産生に

寄与する可能性が示唆された。

PGE₂ 受容体サブタイプのひとつである EP₁ を欠損したマウスを用いて、PGE₂-EP₁ 系が急性腎不全の病態形成にどのように関与しているかを調べるためにシスプラチン誘発急性腎不全モデルを対象とした解析を行った。EP₁ 欠損マウスでは野生型のマウスと比較して、シスプラチン投与後の生存率が改善した。また、シスプラチン投与の 72 時間後における血清クレアチニンや血液尿素窒素の動態を指標とした腎機能障害の程度が、EP₁ 欠損マウスでは野生型のマウスと比較して有意に軽減されることが明らかとなった。この結果は、摘出腎の切片標本を用いて EP₁ 欠損マウスと野生型マウスの腎組織病変の変化を病理学的に解析した結果と相関していた。さらに、尿管障害マーカー分子の Kim-1 の腎臓での mRNA 発現増加が、EP₁ 欠損マウスでは野生型マウスに比べて著明に軽減されることを見出した。PGE₂-EP₁ 系が、シスプラチンによって誘発される急性腎障害の病態において増悪因子として働くことが明らかとなった。

腎障害の一因となる炎症関連因子として、炎症性サイトカインとその受容体の発現について EP₁ 欠損マウスと野生型マウスを用いて比較検討した結果、シスプラチン投与後の野生型マウスの腎臓で認められるインターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- : TNF) および TNF 受容体の発現増加が、EP₁ 欠損マウスでは有意に軽減されることを見出した。さらに、摘出腎中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) を測定することで、酸化ストレスの主要な指標である脂質の過酸化を評価した結果、シスプラチン投与後の酸化ストレスの程度が、EP₁ 欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に軽減していることが明らかとなった。シスプラチン誘発急性腎不全の病態形成において増悪因子として働く PGE₂-EP₁ 系の作用機序のひとつとして、炎症性サイトカイン産生の亢進と酸化ストレスの増大が寄与する可能性が示唆された。

シスプラチン誘発腎不全病態モデルを用いて、急性腎障害に対する EP₁ 拮抗薬の経口投与による効果を検討した。その結果、薬物投与群では対照群に比べて、血清クレアチニンと血液尿素窒素で評価される腎障害の程度が軽減する傾向を認めたものの、EP₁ 欠損マウスを用いた検討から予想された結果とは異なり、現段階では統計的に有意な抑制効果を認めることはできなかった。薬物の投与経路ならびに投与量などの諸条件について、更なる詳細な検討を要すると考えられる。

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6件)

1. Kashiwagi H, Yuhki K, Kojima F, Kumei S, Sakai Y, Narumiya S, Ushikubi F. The novel prostaglandin I₂ mimetic ONO-1301 escapes desensitization in an anti-platelet effect due to its inhibitory action on thromboxane A₂ synthesis in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 353: 269-278, 2015 査読有

2. 小島史章、結城幸一、柏木仁、桑井志麻、牛首文隆：虚血による神経障害の分子メカニズム プロスタノイドの役割 日本臨牀. 72: 121-125, 2014 査読無

3. Kojima F, Frolov A, Matnani R, Woodward JG, Crofford LJ. Reduced T-cell-dependent humoral immune response in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice is mediated by non-hematopoietic cells. *J Immunol.* 191: 4979-4988, 2013 査読有

4. Nakagawa N, Yuhki K, Kawabe J, Fujino T, Takahata O, Kabara M, Abe K, Kojima F, Kashiwagi H, Hasebe N, Kikuchi K, Sugimoto Y, Narumiya S, Ushikubi F. The intrinsic prostaglandin E₂-EP₄ system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice. *Kidney Int.* 82: 158-171, 2012 査読有

5. Kojima F, Yuhki K, Kashiwagi H, Kumei S, Ushikubi F. PG/LT system and inflammation. *Nihon Rinsho.* 70: 231-235, 2012. 査読無

6. 結城幸一、柏木仁、小島史章、牛首文隆 プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた心血管系におけるプロスタノイドの作用。血栓と循環. 20: 4-8, 2012 査読無

[学会発表](計15件)

1. 柏木仁、結城幸一、小島史章、桑井志麻、成宮周、牛首文隆 タバコ煙抽出液は血小板凝集を抑制する 第88回日本薬理学会年会名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)2015年3月20日

2. 桑井志麻、結城幸一、小島史章、柏木仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎におけるプロスタグランジン I₂ の役割解明 第88回日本薬理学会年会名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)2015年3月18日

3. 小島史章 炎症・免疫性疾患病態におけ

るプロスタノイド産生系・受容体シグナル系の役割 第5回 Okayama Young Investigator's Seminar 岡山大学(岡山県岡山市) 2014年11月6日(招待講演)

4. 柏木仁、結城幸一、小島史章、糸井志麻、牛首文隆 タバコ煙抽出液の血小板凝集抑制作用 第65回日本薬理学会北部会 コラッセふくしま(福島県福島市) 2014年9月26日

5. 結城幸一、糸井志麻、柏木仁、小島史章、成宮周、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎におけるプロスタノイドの役割解明 第65回日本薬理学会北部会 コラッセふくしま(福島県福島市) 2014年9月26日

6. Kumei S, Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Okumura T, Ushikubi F. Protective effect of the prostaglandin I₂-IP signal through the suppression of cytokines expression in nonalcoholic steatohepatitis. Digestive Disease Week (DDW) 2014. McCormick Place Convention Center (Chicago, IL, USA) 2014年5月3日

7. 柏木仁、結城幸一、小島史章、糸井志麻、酒井芳紀、成宮周、牛首文隆 トロンボキサン A₂ は連用に伴うプロスタグランジン I₂ 受容体アゴニストであるベラプロストの抗血小板作用減弱において重要な役割を担う 第87回日本薬理学会年会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター(宮城県仙台市) 2014年3月21日

8. 糸井志麻、結城幸一、小島史章、柏木仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎におけるプロスタグランジン I₂ の役割解明 第87回日本薬理学会年会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター(宮城県仙台市) 2014年3月19日

9. 柏木仁、結城幸一、小島史章、糸井志麻、酒井芳紀、成宮周、牛首文隆 プロスタグランジン I₂ 受容体アゴニストの連用に伴う血小板機能抑制作用の減弱はトロンボキサン A₂ 合成酵素阻害薬の併用により回避できる 第23回日本循環薬理学会 福岡大学メディカルホール(福岡県福岡市) 2013年12月6日

10. 小島史章 関節炎における膜型プロスタグランジン E₂ 合成酵素-1の役割 第12回リウマチ膠原病 よつやセミナー 京王プラザホテル(東京都新宿) 2013年9月21日(招待講演)

11. Kumei S, Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Okumura T, Ushikubi F. Protective effect of the prostaglandin I₂-IP signal

in MCD diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice. Digestive Disease Week (DDW) 2013. Orange County Convention Center (Orlando, FL, USA) 2013年5月19日

12. 糸井志麻、結城幸一、小島史章、柏木仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展におけるプロスタグランジン I₂ の役割解明 第86回日本薬理学会年会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2013年3月21日

13. 小島史章、結城幸一、柏木仁、糸井志麻、成宮周、牛首文隆 シスプラチン誘発急性腎障害におけるプロスタグランジン E₂ 受容体サブタイプ EP₁ の役割 第86回日本薬理学会年会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2013年3月21日

14. Kumei S, Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Okumura T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of the prostaglandin I₂-IP system in the development of nonalcoholic steatohepatitis. JST-CREST International Symposium. Frontiers in Immunology & Inflammation: From Molecules to Disease. Hitotsubashi Memorial Hall (Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) 2013年2月13日

15. 糸井志麻、結城幸一、小島史章、柏木仁、奥村利勝、成宮周、牛首文隆 非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展におけるプロスタグランジン I₂ の役割解明 第63回日本薬理学会北部会 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市) 2012年9月14日

〔図書〕(計1件)

1. Kusunoki N, Kojima F, Kawai S. Effects of Adipokines on Prostaglandin E₂ Production by Rheumatoid Synovial Fibroblasts. 'Arachidonic Acid: Sources, Biosynthesis and Health Effects'. p165-183. Nova Science Publishers, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島史章 (KOJIMA, FUMIAKI)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号: 30550545