

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790255

研究課題名(和文) 薬剤性腎障害発現における腎細胞分子機構の解明と腎保護薬に関する薬理学的研究

研究課題名(英文) Pharmacological elucidation of the cellular and molecular mechanisms in drug-induced nephrotoxicity and the prevention.

研究代表者

矢野 貴久 (YANO, TAKAHISA)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：90532846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：抗MRSA薬バンコマイシン(VCM)は、ブタ由来培養尿細管上皮細胞(LLC-PK1)に濃度および時間依存的なアポトーシスを引き起こし、その障害発現には、ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)産生が関与することが明らかとなった。一方、VCMによってLLC-PK1細胞に引き起こされたミトコンドリア機能異常やアポトーシスは、脂溶性抗酸化薬ビタミンEならびにミトコンドリア標的抗酸化薬mitoTEMPOの処置によって有意に抑制された。加えて、VCMはJNKのリン酸化を亢進させ、VCMによる細胞障害に対してJNK阻害薬SP600125が有意な保護効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Anti-MRSA drug vancomycin (VCM) caused the mitochondrial-mediated reactive oxygen species (ROS) generation leading to a concentration- and time-dependent cell apoptosis in cultured renal tubular LLC-PK1 cells. A lipophilic antioxidant vitamin E and a mitochondria-targeted antioxidant mitoTEMPO significantly prevented the VCM-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. VCM also caused phosphorylation of JNK, while a JNK inhibitor SP600125 showed a significant suppression against the VCM-induced cell injury.

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：腎障害 バンコマイシン アポトーシス ミトコンドリア 活性酸素種 MAPK JNK

1. 研究開始当初の背景

医薬品の使用により引き起こされる急性腎不全は薬剤性腎障害と呼ばれ、中でも抗がん薬や抗菌薬、非ステロイド性抗炎症薬やヨード造影剤等による腎障害は発現頻度が特に高い。各薬剤の使用時には、腎障害発現により治療の変更や中止を余儀なくされるほか、患者の長期予後が極めて不良となることも少なくないため、薬剤性腎障害への対策は実臨床における重要な課題の一つである。しかしながら多くの薬剤では、腎細胞や腎組織への直接的な薬理作用は想定外であり、腎障害の発現機序はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤性腎障害の発現機序の解明や対策法の確立を目的として、培養尿細管上皮細胞を用いた腎障害評価モデルを作製し、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養プレートに播種したブタ由来培養尿細管上皮細胞(LLC-PK1細胞)に、抗MRSA(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)薬のバンコマイシンを曝露した際の、用量依存的な細胞生存率の変化を、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) 法を使用したフローサイトメトリー解析にて評価した。

(2) 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 およびミトコンドリアスーパーオキシド指示薬 Mito SOX を使用して、フローサイトメトリーにて解析した。

(3)ミトコンドリアからのシトクロムc遊離の評価は、ミトコンドリアと細胞質を分画した上で、シトクロムcの特異的な抗体を用いた Western blot 法により評価した。

(4)MAPK の評価は、特異的な抗体を用いた Western blot 法により評価した。

(5)【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 細胞にバンコマイシンを処置すると、濃度依存的に TUNEL 陽性細胞が増加した(図1)。一方、4mM のバンコマイシンを LLC-PK1 細胞に処置すると、時間依存的に細胞内 ROS ならびにミトコンドリアスーパーオキシドが上昇し、それらの上昇はビタミン E の併用処置によって有意に抑制された(図2、図3)。

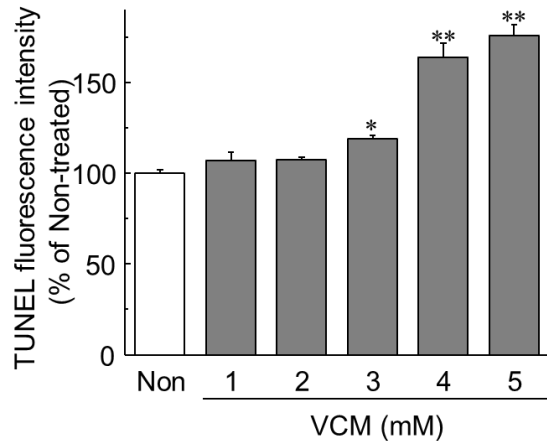


図1 バンコマイシン(VCM)処置による濃度依存的な TUNEL 陽性細胞の増加
各カラムは平均値 ± SEM (N=4) を示す。
*P<0.05, **P <0.01 vs Non-treated

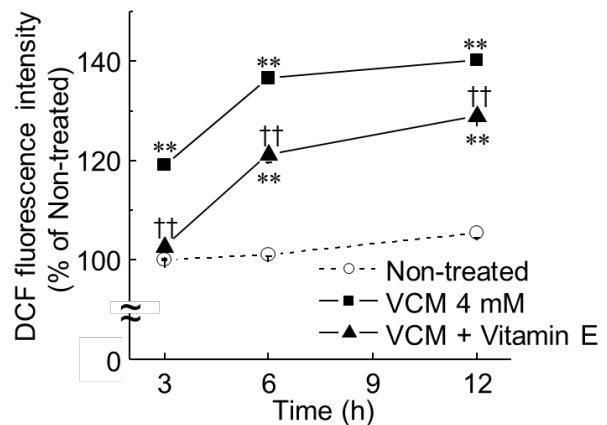


図2 バンコマイシン(VCM)処置による時間依存的な細胞内 ROS 上昇
各プロットは平均値 ± SEM (N=4) を示す。
**P <0.01 vs Non-treated
†P<0.05, ††P<0.01 vs VCM

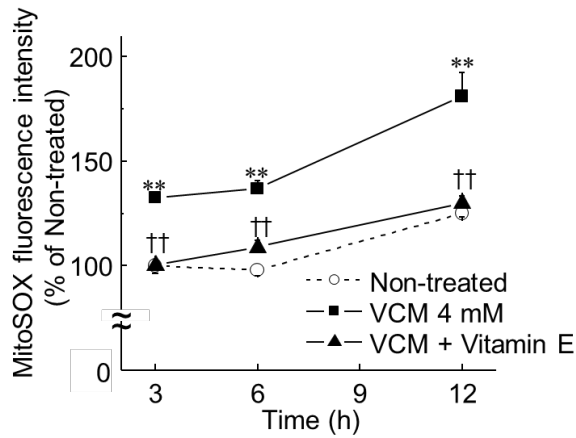


図3 バンコマイシン(VCM)処置による時間依存的なミトコンドリアスーパーオキシドの上昇各プロットは平均値 ± SEM (N=4) を示す。
^{**}P < 0.01 vs Non-treated
^{††}P < 0.01, [†]P < 0.05 vs VCM

(2) バンコマイシンを LLC-PK1 細胞に処置すると、細胞質画分におけるチトクロム c 蛋白量が顕著に増加し、その増加はビタミン E および MitoTEMPO の併用処置によって抑制された (図 4)。

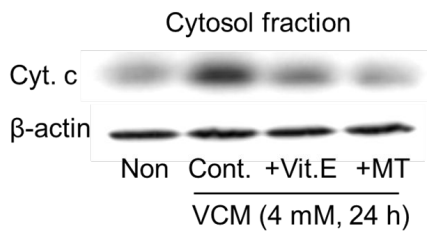


図4 VCM 処置による細胞質画分のチトクロム c 蛋白量の増加と、ビタミン E (Vit. E) および MitoTEMPO (MT) の効果

(3) 細胞内のリン酸化および総 JNK 蛋白量の変化を Western blot 法により評価した結果、バンコマイシンの処置によって、時間依存的にリン酸化 JNK 量が増加した (図 5)。

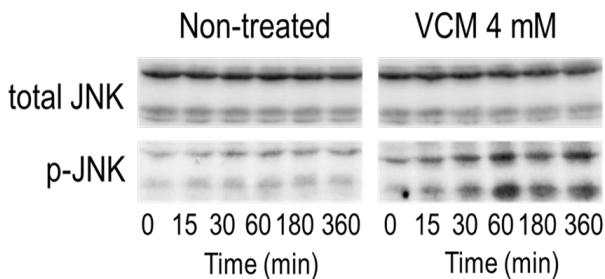


図5 VCM 処置によるリン酸化および総 JNK 蛋白量の時間依存的変化

(4) バンコマイシンを LLC-PK1 細胞に処置した際の TUNEL 陽性細胞の増加に対して、ビタミン E や MitoTEMPO、および JNK 阻害薬 SP600125 は有意な保護効果を示した (図 6、図 7)。

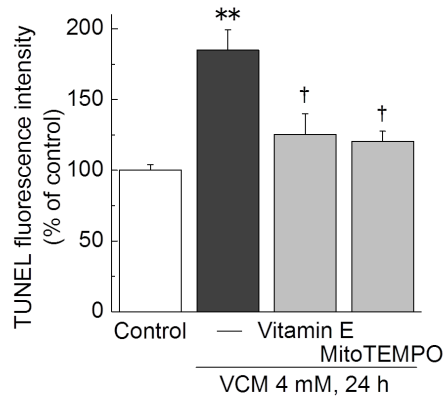


図6 VCM 処置による TUNEL 陽性細胞の増加に対するビタミン E および MitoTEMPO の効果各プロットは平均値 ± SEM (N=4) を示す。
^{**}P < 0.01 vs Control, [†]P < 0.05 vs VCM

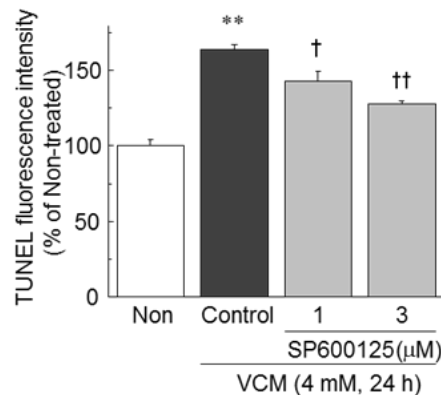


図7 VCM 処置による TUNEL 陽性細胞の増加に対する JNK 阻害薬 SP600125 の効果各プロットは平均値 ± SEM (N=5) を示す。
^{**}P < 0.01 vs Control,
[†]P < 0.05, ^{††}P < 0.01 vs VCM

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 6 件)

矢野貴久

バンコマイシン誘発腎細胞障害におけるミトコンドリア由来活性酸素種の関与とビタミン E の効果.

第 15 回 Vitamin E UpdateForum

平成 24 年 8 月 26 日, 東京都

坂本裕哉, 矢野貴久, 平野めぐみ, 牛島悠喜, 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とミトコンドリア標的抗酸化剤の効果.
医療薬学フォーラム 2012 / 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム
平成 24 年 7 月 14 ~ 15 日, 福岡市

矢野貴久.
薬剤性腎障害発現におけるミトコンドリア分子機構の解明と腎保護薬に関する薬理学的研究.
第 86 回日本薬理学会年会
平成 25 年 3 月 21 ~ 23 日, 福岡市

坂本裕哉, 矢野貴久, 牛島悠喜, 花田有希, 平野めぐみ, 江頭伸昭, 大石了三.
バンコマイシン誘発腎細胞アポトーシスの分子機構と抗酸化剤の保護効果.
第 86 回日本薬理学会年会
平成 25 年 3 月 21 ~ 23 日, 福岡市

坂本裕哉, 矢野貴久, 花田有希, 竹下亜希, 江頭伸昭, 大石了三.
バンコマイシンによる尿細管上皮細胞障害における MAPK の関与.
第 66 回日本薬理学会西南部会
平成 25 年 11 月 16 日, 福岡市

坂本裕哉, 矢野貴久, 花田有希, 竹下亜希, 大石了三, 江頭伸昭, 増田智先.
バンコマイシン誘発尿細管上皮細胞障害発現における活性酸素種の役割.
日本薬学会第 134 年会
平成 26 年 3 月 27 ~ 30 日, 熊本市

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: