

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870245

研究課題名(和文) 抗菌薬による腎障害の分子機序の解明と予防法の検討

研究課題名(英文) Antibiotics induced renal injury; explanation for the mechanism and strategy for the prevention

研究代表者

青木 信将 (AOKI, Nobumasa)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：60646933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性菌感染症が問題となっている。バンコマイシンやコリスチンはこれら耐性菌感染症のキードラッグだが、その腎毒性のため臨床的な有効性が制限されている。我々は尿細管の膜トランスポーターに注目し、腎障害の分子機序の解析を行った。水晶発振子マイクロバランス法やノックアウトマウスを用いることで腎障害の標的分子としてメガリンが確認された。さらにメガリンリガンド拮抗剤を同定し、その腎障害軽減作用をマウス腎障害モデルで評価している。抗菌薬腎障害の有望な予防薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：Multidrug-resistant organisms become more problematic worldwide. Although vancomycin and colistin has been key drug against these infections, their nephrotoxicity limited clinical efficacy. We focused on the transporter of proximal renal tubule and analyzed the mechanism responsible for the development of renal involvement. Megalin was identified as a target molecule of the nephrotoxicity through experiments with knock-out mouse and QCM (quartz crystal microbalance). Megalin ligand antagonist was also detected. Megalin ligand antagonist reduced renal damage in mouse model, and held the promise of treating drug-induced renal impairment.

研究分野：感染症

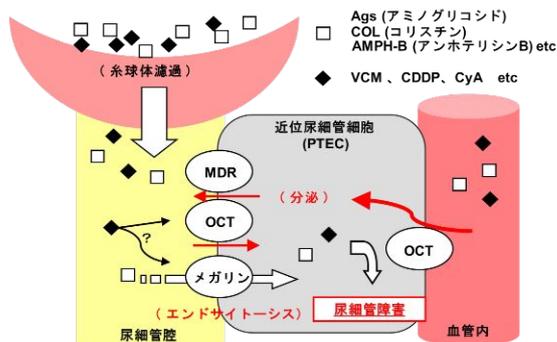
キーワード：メガリン コリスチン バンコマイシン 薬剤性腎障害

1. 研究開始当初の背景

近年多剤耐性菌の増加が問題となっているが、抗菌薬の新規開発は滞っている。そのため既存の抗菌薬の有効利用が重要とされ、薬物動態/薬力学(PK/PD)理論による投与方法の変更・増量及び併用療法が盛んに検討されている。しかしそれらに伴う副作用の増加が報告され、特に腎障害は重大な問題である。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症に対する vancomycin(VCM)や、近年社会問題となっている多剤耐性グラム陰性菌(緑膿菌、アシネトバクター、NDM-1 産生菌)感染症での唯一の特効薬といえる colistin(COL)においても、副作用の腎障害が耐性菌治療における最大の障壁となっている。特に COL については腎障害の発生頻度が 40% に及ぶとも報告され、その解決が喫緊の課題となっている。

我々はこれまで抗菌薬による腎障害に関して、アミノグリコシド系薬(AGs)による腎障害を中心に検討を行ってきた。近位尿細管上皮細胞(PTEC)の管腔側には糸球体濾過蛋白質の再吸収・代謝を担うエンドサイトーシス受容体メガリンが発現し、それを介して AGs が尿細管腔から PTEC へ再吸収され、高濃度に蓄積した結果、尿細管障害を生じることが判明している(図 1)。VCM、COL に関する基礎研究は不足しており、その腎障害機序については明らかでない。しかし、AGs、VCM、COL は、薬物動態の面で類似点が多く、同様の PTEC 再吸収機構が関与している可能性が考えられる。

図 1. 近位尿細管での分泌・再吸収



2. 研究の目的

本研究の目的は、抗菌薬による腎毒性の発現と PTEC における膜トランスポーター、特にメガリンとの関連性を解明し、薬剤性腎障害の機序を明らかにすることである。さらにメガリンをターゲットとした腎障害の予防法と検査法を開発することにより耐性菌感染症の新しい治療戦略の基盤確立を目指した。

具体的には、メガリンやその他の膜トランスポーターについて、COL や VCM との結合性と腎障害の誘導性を検討した。さらに標的分子のリガンドを解析することで腎障害軽減薬として有望な拮抗剤の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) COL 及び VCM と膜トランスポーターとの結合性の確認、拮抗剤候補物質の探索
既にモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィによりラット刷子縁からメガリン精製に成功しており、それを利用して水晶発振子マイクロバランス法(QCM法)を用いて精製メガリンとの結合性の解析を行った。具体的には水晶発振子表面に精製メガリンを固定化し、そこへ AGs、COL、VCMなどを添加、メガリンとの結合量を水晶発振子の振動数の変化として測定し定量を行った。結合の有無、結合量を評価している。さらにシラスチン(CS)、シスプラチン(CDDP)、ホスミンなどについても結合性を確認した。メガリンリガンドと確認された物質については、上記 AGs、COL、VCM などとの併存下でメガリンとの結合量を再度評価することで、競合阻害の有無について解析を行った。

(2) 腎障害におけるメガリンの関与の検討
メガリンとの結合が確認された抗菌薬について、メガリンが腎障害に関与するか動物モデルでの検証を行った。腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウス ApoE-cre において VCM、COL をそれぞれ腹腔内及び皮下に複数回投与を行い、薬剤性腎障害モデルを作成した。腎組織像を確認し、免疫染色(メガリン染色、KIM-1 染色など)でメガリン発現部位と尿細管障害発現の関与を分析した。さらに尿中、血中の腎障害マーカー(BUN、cre、NAG、β2MG など)の測定を行っている。

(3) メガリンリガンド拮抗剤の腎障害軽減効果の検証

メガリンリガンド候補物質の中から結合性が確認され、さらに COL や VCM との競合阻害が認められたものをメガリンリガンド拮抗剤として、腎障害軽減効果を動物モデルで検証した。C57BL/6 を用いたマウス腎障害モデルやラット腎障害モデルを用いて、メガリンリガンド拮抗剤による腎障害の軽減作用を分析した。VCM 腎障害モデル、COL 腎障害モデルにおいて上記抗菌薬とメガリンリガンド拮抗剤を同時投与し、拮抗剤の有無による腎組織像や尿中、血中の腎障害マーカーの推移を測定した。

(4) メガリンリガンド拮抗剤併存下での抗菌力の検討

メガリンリガンド拮抗剤存在下で抗菌活性の変化がみられるか検証を行った。メガリンリガンド拮抗剤存在下と抗菌薬単独投与下において、ディスク法・microdilution プレート法を用いて抗菌活性を測定することで、相互作用の有無を評価した(方法は CLSI に準拠)。菌株は VCM に対しては黄色ブドウ球菌標準株 ATCC 25923 株を、COL に対しては大腸菌標準株 ATCC 25922 株を使用した。

(5)臨床症例における検討

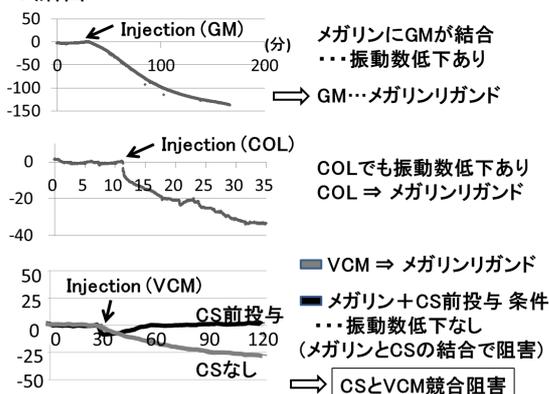
薬剤性腎障害との関連が考えられるメガリンについて、その評価系が腎障害の新たな検査法として有用な可能性があり、臨床例で検討を行った。尿中メガリン、特に細胞外領域測定系の A-メガリンと既存のバイオマーカー(KIM-1、シスタチン C、N-Gal、NAG、β2MG など)について、肺癌治療でのシスプラチン投与例、MRSA 感染症での VCM 投与例で前向き観察研究による評価を行った。

また、VCM 投与例については後方視的検討により、メガリンリガンド拮抗剤と考えられるシラスタチン併用例での腎障害の有無について解析を行った。

4. 研究成果

(1)COL 及び VCM と膜トランスポーターとの結合性の確認、拮抗剤候補物質の探索
QCM 法を用いた検討でまず既知のメガリンリガンドのゲンタマイシン(GM)とメガリンの結合をみてもと振動数低下が認められ、メガリンリガンドであることが確認された。次に VCM、COL で同様の実験を試みると、VCM や COL でも振動数低下が認められ水晶発振子に固定化したメガリンとの結合が生じていることが示された。尿細管でのメガリンによるエンドサイトーシスが生じている可能性が考えられる。また、CS の結合も確認すると振動数低下を認め、同様にメガリンリガンドであると考えられた。さらに、CS を前投与した条件で VCM や COL の結合の有無を QCM 法で確認すると、振動数低下は認められなかった。CS と VCM 及び COL とで競合阻害が起こった結果と考えられる。CS は腎毒性を生じない薬剤であり、薬剤性腎障害に対してメガリンリガンド拮抗剤として有望と考えられる(図 2)。

図 2. QCM 法 メガリンと GM・COL・VCM の結合

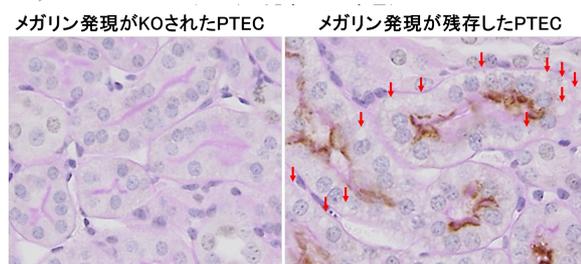


(2)腎障害におけるメガリンの関与の検討

腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウス ApoE-cre において、COL による薬剤性腎障害発現を確認した。投与量に応じて軽度の尿細管障害から重度の糸球体障害まで

生じることが腎組織像で認められたが、メガリン染色を行うと、メガリン発現部位に一致して近位尿細管の空胞変性や細胞脱落が生じていた。さらに KIM-1 染色においてもメガリン発現部位に一致した尿細管障害が認められている。メガリンによるエンドサイトーシスで尿細管に再吸収され、蓄積した結果、尿細管障害が生じたものと考えられる(図 3)。

図 3. COL を投与された ApoE-cre メガリン KO マウスの腎組織(メガリン染色 + PAS 染色)

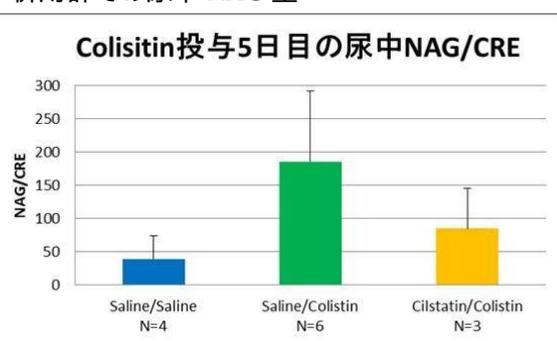


メガリン発現PTEC; 細胞質内に多数の空胞(↓)
⇒ COLによるPTEC障害はメガリン依存性

(3)メガリンリガンド拮抗剤の腎障害軽減効果の検証

C57BL/6 を用いたマウス腎障害モデルにおいて、有望なメガリンリガンド拮抗剤と考えられた CS の同時投与を行った。CS 同時投与群は CS 非併用群に対して腎組織像における尿細管障害の軽減が認められた。さらに、ラット腎障害モデルにおいて尿中の腎障害マーカーの測定を行うと、COL 単独投与に比して COL/CS 併用群で尿中 NAG の低下傾向がみられている。動物実験において CS による薬剤性腎障害軽減作用が示された結果と考えられる(図 4)。

図 4. ラット腎障害モデル; COL 群、COL/CS 併用群での尿中 NAG 量

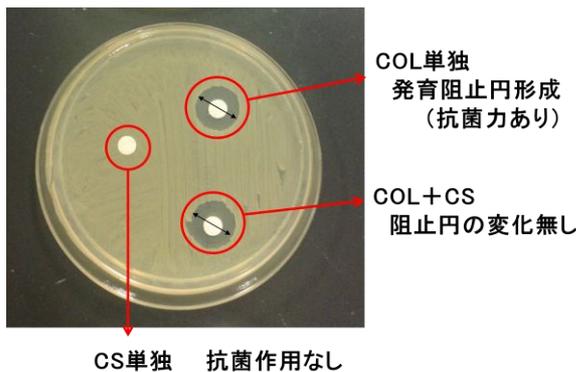


(4)メガリンリガンド拮抗剤併存下での抗菌力の検討

CS による薬剤性腎障害軽減効果が示されたが、抗菌活性の変化がないか in-vitro で確認している。まずディスク法を用いて、COL 及び VCM について CS 存在下での阻止円の変化を測定した。いずれも CS 単独では抗菌活性を認めず、VCM・COL 単独と CS との併用では阻止円径に変化を認めなかった(図 5)。

現在、microdilution プレートを用いた最少発育阻止濃度の測定、チェッカーボード法による相互作用の確認を行っている。今後、薬物動態の変化の確認目的に動物実験を行う予定である。

図 5. 大腸菌 ATCC 25922 株における COL、CS、COL + CS の阻止円の比較



(5)臨床症例における検討

メガリンを介した尿細管障害の検査系として尿中メガリンの測定が有用である可能性があり、他のマーカーとともに臨床例で測定を行った。まず肺癌治療で CDDP 投与を行った症例で前向きな予備検討を行っている。

尿中 A-メガリンにおいて、他のマーカーに比し腎障害発症例で特異的な早期からの上昇が認められ、さらに急性腎障害を生じた症例では投与前から A-メガリンが高値を呈する傾向がみられ、腎障害の予測マーカーとして有用である可能性を示している(図 6)。MRSA 治療に対して VCM 使用例でも前向き観察研究を開始し、現在解析中である。

VCM については、イミペネム/CS 併用例での後方視的解析も行っている。CS が同時に投与された症例では、血清クレアチニンが 0.3mg/dl 以上上昇もしくは 1.5 倍以上となるような急性腎障害の発生率が少ないことが確認された。血清クレアチニン値の推移をみても CS 併用群ではクレアチニンの上昇が少ないことが示されている(図 7)。CS によるメガリンを介した薬剤性腎障害軽減作用を示したものと考えられる。現在、院内肺炎患者、特に晩期発症人工呼吸器関連肺炎患者を対象に前向き研究を進めている。

図 6. 肺癌治療で CDDP を使用した 10 例尿中 A-megalin の推移

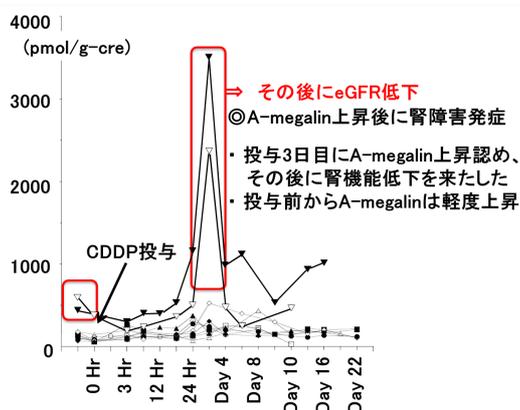
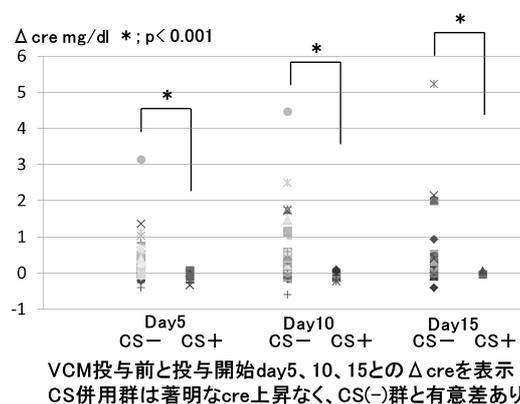


図 7. MRSA 治療で VCM 使用症例血清クレアチニン値(s-cre)の変化量



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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

田邊嘉也、青木信将. シンポジウム「特殊病態下の感染症」慢性腎臓病(CKD)と感染症. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会. 2014 年 10 月 30 日. 東京ドームホテル(東京都文京区)

齋藤亮彦、青木信将. 薬剤性腎障害とメガリン. 日本腎臓学会東部学術大会. 2014 年 10 月 25 日. ベルサール新宿グランド(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: メガリン拮抗剤

発明者: 齋藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織

権利者：斎藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原
頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織、味の
素株式会社、新潟大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/51718
出願年月日：2015年1月22日
国内外の別：外国

名称：メガリンリガンド拮抗剤
発明者：斎藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原
頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織
権利者：斎藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原
頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織、味の
素株式会社、新潟大学
種類：特許
番号：特願 2014-011530
出願年月日：2014年1月24日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 信将 (AOKI, Nobumasa)
新潟大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：60646933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし