

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460631

研究課題名(和文) 腎尿細管のメガリンを誘導する薬物の安全性に関する研究-カドミウムを用いた検討-

研究課題名(英文) Safety of drugs inducing megalin in renal tubules using cadmium

研究代表者

細畑 圭子 (Hosohata, Keiko)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10547962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎近位尿細管における再吸収過程においてカドミウム取込みを担うエンドサイトーシス受容体を保持している培養細胞系を用いて種々の薬物を曝露させた。その結果、エンドサイトーシス受容体の mRNA 発現量が有意に上昇するとともに、細胞内のカドミウム量が蓄積することを明らかにした。さらに、有意な細胞障害が認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the mRNA expressions of endocytic receptors in cultured cells, which are involved in reabsorption of cadmium in renal tubular cells, significantly increased and accompanied with increase in concentration of cadmium, resulting in cytotoxicity with exposure to several drugs.

研究分野：医療薬学

キーワード：腎臓 尿細管 カドミウム エンドサイトーシス 薬物有害反応 毒性

1. 研究開始当初の背景

カドミウムをはじめとする重金属による環境汚染は現在でも世界的に進行しており、長期摂取による人体への影響が危惧されている。カドミウムの曝露は食品（我が国では米）、水、喫煙、労働環境を通じて起こる。食品中カドミウムは土壌、水質中に存在するカドミウムが移行したものである。火山の影響や歴史的な鉱山開発により我が国における土壌中カドミウムレベルは高い。

カドミウムは加齢に伴い徐々に体内に蓄積し、特に腎臓への蓄積が顕著である。カドミウムは体内に摂取されると排泄速度が遅く生物学的半減期が極めて長い（ヒトの生物学的半減期は、腎 17 年、肝 7 年と計算されている）。したがって、低用量でもカドミウム曝露が長期にわたれば、数十年後には腎臓内のカドミウム濃度が有害レベルに達し腎機能障害を起こす可能性がある。カドミウム腎症は腎系球体ではなく近位尿細管の障害を主な特徴とし、予後不良である。したがって、カドミウム蓄積を増強させないことが重要である。

ヒトがカドミウムを経口摂取した場合、消化管から吸収されたカドミウムは肝臓でメタロチオネンと結合して血中に移行する。系球体濾過されたカドミウム-メタロチオネン複合体は近位尿細管に存在するエンドサイトーシス受容体を介して再吸収される。したがって、エンドサイトーシス受容体の発現を亢進させる薬物は、カドミウムの蓄積を増強させると考えられるが、そのような報告はこれまでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、カドミウムが腎尿細管エンドサイトーシス受容体であるメガリンを介することに着目し、メガリンを誘導する薬物がカドミウム蓄積および毒性を亢進させるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プタ由来腎上皮細胞株 LLC-PK1 細胞を用いて候補薬物である PPAR アゴニスト（ピオグリタゾン、ロシグリタゾン）を曝露した。

(2) 細胞ライセートより RNeasy Mini キット（キアゲン、米国）を用いて RNA を抽出し、逆転写後に TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR システム（サーモフィッシュサイエンティフィック、米国）によりメガリン mRNA 量を測定した。データは *gapdh* 遺伝子を内在性コントロールとして用いた比較 Ct 法により解析した。

(3) 偏光ゼーマン原子吸光光度計（日立ハイテクサイエンス、東京）を用いてカドミウム濃度を測定した。

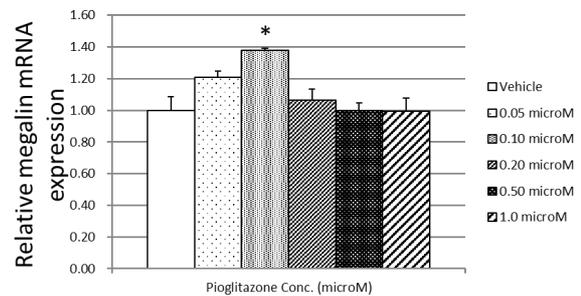
(4) 細胞障害性を LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ株式会社、草津)にて評価した。

(5) 統計解析

データは SPSS ソフトウェア (ver. 16.0J、日本 IBM、東京) を用いて ANOVA により解析した。

4. 研究成果

LLC-PK1 細胞のメガリン mRNA 発現量について、ピオグリタゾン曝露による濃度依存性は飽和性を示し、0.1 μM で有意に高値を示した (図 1)。

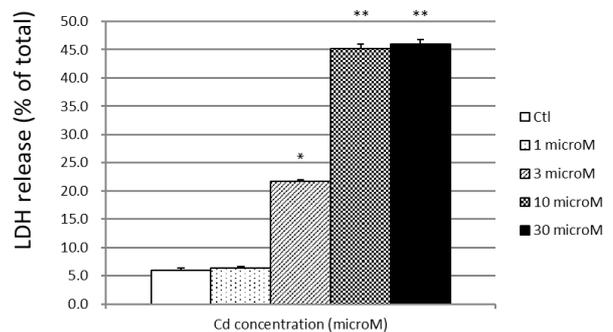


Data are means ± SE (n = 4).
*P<0.05 vs. vehicle

図 1. LLC-PK1 細胞における PPAR アゴニストが及ぼすメガリン mRNA 発現量への影響

一方、LLC-PK1 細胞におけるカドミウム蓄積は濃度依存的であった。

さらに、カドミウム曝露による有意な細胞障害性についても、濃度依存性が認められた (図 2)。



Data are means ± SE (n = 6).
*P<0.05 vs. vehicle

図 2. LLC-PK1 細胞におけるカドミウム曝露による細胞障害性

以上の結果は、腎尿細管カドミウム輸送体

の発現を調節する薬物がカドミウムの蓄積および細胞毒性に關与することを示唆している。

今後、低濃度カドミウム摂取下ラットにおいて PPAR アゴニストによるカドミウム蓄積および腎尿細管障害惹起について明らかにしていく予定である。さらに、PPAR アゴニスト以外の薬物または化合物についても *in vitro* および *in vivo* において検討し、カドミウム蓄積を亢進させる薬物のスクリーニング構築へと発展させる予定である。

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 7 件)

1. Hosohata K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. *Int J Mol Sci.* **17**: E1826, 2016. 査読有、doi: 10.3390/ijms18010178.
2. Hosohata K, Washino S, Kubo T, Fujisaki A, Kurokawa S, Ando H, Fujimura A, Morita T. Early prediction of cisplatin-induced nephrotoxicity by urinary vanin-1 in patients with urothelial carcinoma. *Toxicology*, **359-360**: 71-75, 2016. 査読有、doi: 10.1016/j.tox.2016.06.011.
3. Hosohata K, Yoshioka D, Tanaka A, Ando H, Fujimura A. Early urinary biomarkers for renal tubular damage in spontaneously hypertensive rats on a high-salt intake. *Hypertens Res.* **39**: 19-26, 2016. 査読有、doi: 10.1038/hr.2015.103.
4. 細畑圭子、安藤 仁、竹下友美枝、御簾博文、篁 俊成、金子周一、藤村昭夫。糖尿病腎症の早期診断・治療に向けたバイオマーカーの基礎および臨床検討。月刊細胞, **48**: 35-37, 2016. 査読なし
5. 細畑圭子。消化器疾患治療薬の薬物相互作用。月刊薬事, **55**: 77-82, 2016. 査読なし
6. 細畑圭子、鷲野聡、久保太郎、藤崎 明、寺内文人、夏井信輔、貫井昭憲、黒川真輔、森田辰男、藤村昭夫。薬物性腎障害の早期検出尿中バイオマーカーの臨床評価。臨床薬理の進歩 2015, **36**: 171-175, 2015. 査読なし
7. Washino S, Ando H, Ushijima K, Hosohata K, Kumazaki M, Mato N, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Fujimura A, and Morita T. Temsirolimus induces surfactant lipid accumulation and lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **306**: L1117-28,

2014. 査読有、doi: 10.1152/ajplung.00251.2013.

[学会発表](計 6 件)

1. 細畑圭子。JSCPT 認定薬剤師としての活動。第 37 回日本臨床薬理学会年会。2016 年 12 月 1 日。米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)。
2. 細畑圭子。胃酸分泌抑制薬の薬物間相互作用。第 36 回日本臨床薬理学会年会。2015 年 12 月 10 日。京王プラザホテル(東京)。
3. 細畑圭子、安藤 仁、竹下友美枝、御簾博文、篁 俊成、金子周一、藤村昭夫。糖尿病性腎症を早期に検出するための尿中バイオマーカー Kim-1 の有用性。第 29 回日本糖尿病合併症学会。2014 年 10 月 3 日。都市センターホテル(東京)。
4. 細畑圭子、藤村昭夫。自然発症高血圧ラットにおける食塩過剰摂取による腎尿細管障害の進展とその特徴。新規尿細管マーカーに着目した検討。第 37 回日本高血圧学会学術総会 2014 年 10 月 19 日。パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。
5. 細畑圭子、藤村昭夫。薬物性腎障害バイオマーカーの開発。第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 2014 年 12 月 4 日。ひめぎんホール(愛媛県松山市)。
6. Hosohata K, Yoshioka D, and Fujimura A. Urinary excretions of newly developed biomarkers for renal tubular damage during a repeated high-salt intake in spontaneously hypertensive rats. 19th North American ISSX Meeting, October 19-23, 2014. San Francisco, (CA, USA).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/rinshoyakugakukyokuikucenter.html>

大阪薬科大学研究シーズ集:

<http://www.oups.ac.jp/gakujutsu/seeds/pdf/seeds2016.pdf>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細畑圭子 (HOSOHATA, Keiko)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：10547962

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし