

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860101

研究課題名(和文)薬剤性腎障害の重篤化阻止に向けた腎臓内在性炎症抑制システムの役割解明

研究課題名(英文)Roles of anti-inflammatory system after drug-induced kidney injury

研究代表者

中川 俊作(Nakagawa, Shunsaku)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：50721916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床における薬剤性腎障害の発症は半数以上が重篤化し、進行性の腎機能低下や死亡の要因となる可能性がある。本研究では、腎臓の頑健性(Robustness)を実証することを目指し、腎臓に内在する炎症抑制システムに着目した解析を行った。

腎毒性を有するシスプラチンをマウスに投与したところ、炎症性サイトカインであるIL-6およびCCL2の腎臓内での発現が早期より認められ、抗炎症性サイトカインであるIL10やIL27の発現量はそれに引き続いて上昇することが示された。従って、シスプラチンによる腎障害時には促炎症システムと抗炎症システムが順次活性化されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced kidney injury (DKI) can cause progressive renal dysfunction and sever systemic outcomes. However, there are few approaches to repair or resolve the inflammation and fibrosis after DKI. In this study, we tried to identify the intrinsic anti-inflammatory system in the kidney.

After the administration with cisplatin, the expression levels of pro-inflammatory cytokines, IL-6 and CCL2 were significantly increased in the mouse kidneys at day2 after the treatment. On the other hands, the expression levels of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and IL-27 were increased in the kidney at 7 days after the administration. Taken together, there results suggested the active roles of anti-inflammatory system in the kidney during cisplatin-induced kidney injury.

研究分野：臨床薬学

キーワード：薬剤性腎障害 尿細管間質性腎炎

1. 研究開始当初の背景

薬物治療の多様化に伴い、薬剤性腎障害の発症頻度が年々上昇している。入院中における薬剤性腎障害の発症は入院患者数全体の約5%に見られ、腎障害発症後は50%以上が進行性の腎機能低下を来すとされる。腎障害の遷延は尿毒症物質の蓄積や体液バランスの崩壊を介して生命維持機構の破綻を惹起する。そのため、抗がん剤や抗生物質など腎障害を誘発する恐れのある薬物を使用する際には腎機能に応じた薬物投与設計を行い、服薬中の腎障害発症を発見した際には適切な治療を行うことが必要となる。しかし、このような薬物治療適正化のための科学的基盤は未整備なままであり、特に、腎障害発症後の重篤化を阻止し腎臓の再生を可能とする医療技術の開発が必須である。以上の背景から、薬剤性腎障害の可逆性・不可逆性を決定する機序を解明し、臨床へ応用することが重要な研究課題と位置づけられる。そこで本研究では、腎臓が持つ「頑健性 (Robustness)」低下が薬剤性腎障害重篤化の要因であると考え、腎障害進展の変動因子として腎臓に内在する炎症抑制システムに着目した研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

腎毒性を有する白金系抗がん剤シスプラチンをラットに投与すると、臨床用量のシスプラチン投与後は一時的に腎排泄能の低下と炎症を惹起するが、その後腎機能は正常時と同程度にまで回復することが知られる。従って、腎臓には外的ストレスに対する頑健性が備わっていることが想起され、以下の仮説を立てた。

- (1) 健全な腎臓に障害が起きると局所部における炎症や線維化によって組織修復が促進され、続いて、炎症抑制システムによって炎症や線維化が沈静化されることで恒常性が維持される。

さらに、虚血再灌流障害や腎毒性物質の暴露によって生じた腎尿細管上皮細胞の細胞死は、周辺の炎症性細胞や線維芽細胞に発現するパターン認識受容体 Toll-like receptor (TLR) によって積極的に認識されることが示されている。また、最近の研究報告から、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell) や一部の樹状細胞、及びこれらの細胞から分泌される IL-10、IL-27 や IL-35 といった抗炎症性サイトカインが生体恒常性維持を司る炎症抑制システムとして働くことが明らかにされている (Banchereau J, et al. *Nat Immunol.* 2012; 13: 925-931)。腎臓における抗炎症性サイトカインの役割については、ロックアウトマウスを用いた解析から、IL-10 がシスプラチン腎症に伴う好中球浸潤に対して抑制的に働くことが示されている (Tadagavadi RK, Reeves WB. *J Immunol.* 2010; 185: 4904-4911)。従って、

腎臓においても炎症抑制システムの存在が強く示唆された。一方、腎機能低下患者及び高齢者における薬剤性腎障害の発症は重篤化しやすいこと (Schmitt R, et al. *Am J Kidney Dis.* 2008; 52: 262-271) 並びに、薬物による腎障害発現は継続服用中に生じることが少なくないことから、以下の仮説を立てた。

- (2) 加齢変化や薬物の繰り返し投与は腎臓の炎症抑制システム機能を低下させる。そのため、高齢者や潜在的な腎機能低下患者の腎臓では薬剤性腎障害発症後の炎症や線維化を沈静化するシステムが働かず、不可逆的な腎機能低下へと陥り易い。

本研究課題ではこれら2つの仮説を検証し、腎再生療法創出につながる知見確立を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 薬剤性腎障害発症後の腎再生過程における内在性炎症抑制システムの役割解析

申請者は、内在性炎症抑制システムによって腎障害の可逆性が制御されることを想定した。そこで、薬剤性腎障害動物モデルを用いて腎臓中における炎症抑制細胞及び抗炎症性サイトカインの活性を検討した。また、炎症抑制細胞や抗炎症性サイトカインの働きを阻害する中和抗体を用いて腎障害発症後における役割解明を試みた。具体的な方法は以下と通りである。

可逆性を示す薬剤性腎障害動物モデルを用いた病態の評価

申請者は以前に、シスプラチン及びグリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンを用いた解析を行い、これらの薬物をラットに対し単回投与した後の腎障害が可逆的であることを明らかにした。本研究では、炎症に対して抑制的に働く Regulatory T cell や樹状細胞、及び、IL-10、IL-27 や IL-35 といった抗炎症性サイトカインに着目し、腎障害の可逆性制御機構を解析した。初年度には、細胞死・炎症・線維化を指標として病態の重篤度を定量的に評価し、シスプラチン及びバンコマイシンによる腎障害の可逆性について詳細な定義を行った。さらに、薬物投与後のラット腎臓における抗炎症性サイトカイン発現量の継時的変化を解析し、腎障害からの再生過程における炎症抑制システムの活性を評価した。

腎臓から単離した白血球及び線維芽細胞を用いた細胞生物学的解析

腎障害の進展を制御するサイトカインなどの液性因子は由来細胞から間質領域へと分泌されることで周辺に作用を及ぼす。本項目では、腎臓における抗炎症性サイトカインの産生細胞及び標的細胞を同定することを目的として、*ex vivo* 実験系を用いた解

析を行った。薬物投与後のラット腎臓から単球、リンパ球及び線維芽細胞を単離して細胞生物学的解析を行った。同時に、ラット腎臓から間質成分を抽出し、単離した細胞に対する炎症誘導活性を解析した。

中和抗体を用いた阻害実験による炎症抑制細胞及び抗炎症性サイトカインの役割解析

炎症に関わる細胞やサイトカインの活性は、特異的な抗体を用いて中和・阻害することができる。そこで、薬物による腎障害誘発後に中和抗体を投与することで、腎障害の進展過程又は再生過程における炎症抑制細胞や抗炎症性サイトカインの役割を解析した。

(2) 腎障害の繰り返し及び炎症抑制システムに及ぼす影響の解析

腎毒性を有する薬物の繰り返し投与による、不可逆的な病態を示す腎障害モデルの作製

薬剤性腎障害重篤化の危険因子として高齢や潜在的な腎機能低下状態が明らかにされている。腎障害の既往や加齢変化は「腎障害の蓄積」と理解されることから、本研究では臨床用量の薬物を繰り返し投与することによって不可逆的な病態を示す実験モデルの作製を試みた。

本研究では、臨床における薬剤性腎障害の重篤化は内在性炎症抑制システムの機能低下に起因すると仮説を立てた。腎障害の既往や加齢変化は「軽微な腎障害の蓄積」と理解されることから、腎毒性を有する薬物の繰り返し投与によって不可逆的な病態を示す腎障害モデルの作製を試みた。作製した腎障害モデルを用いて、炎症抑制システムの機能と腎障害の重篤度との関連性を解析した。

新規薬剤性腎障害動物モデルを用いた炎症抑制細胞及び抗炎症性サイトカインの活性評価

疾患モデルとして決定した不可逆的な病態を示す薬剤性腎障害モデルを用いて、腎障害の繰り返し及び炎症抑制細胞及び抗炎症性サイトカインの活性に及ぼす影響を解析した。さらに、血清や尿中における種々サイトカイン濃度を測定し、診断ツールとしての評価を行った。

病態の定量的評価に基づいたPK/PD解析
すでに定量化した病態の重篤度及びサイトカインの発現量を薬物による毒性発現の指標として用い、薬物の血中濃度または腎蓄積量との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) 臨床における検討

本研究において、実験モデルを用いた解析に先立ち、臨床における薬剤性腎障害の実態を明らかにすることを目指した。その結果、抗がん剤であるシスプラチンは軽微であるが不可逆的な腎機能低下を惹起することを示した。これまで、シスプラチンによる腎機能への影響は短期的なもののみが注目されていたが、本研究により、シスプラチンが長期的な腎機能の予後へ及ぼす影響を明らかにすることができた。さらに、シスプラチンの投与回数が増えるとともに腎機能が徐々に低下すること、シスプラチンを除く白金系抗がん剤ではこのような副作用を認めないことも判明した。従って、本研究において当初掲げていた、腎毒性薬物の繰り返し曝露は腎機能を不可逆的に低下させる、という仮説を臨床的に示すことができた。

(2) 実験による検討

続いて、マウスを用いた疾患モデルの解析から、シスプラチンは腎臓の尿細管上皮細胞を障害するが、この障害は尿細管上皮細胞および内皮細胞からのサイトカイン放出を介して炎症を惹起することを見出した。さらに、炎症性サイトカインであるIL-6およびCCL2の腎臓内における発現はシスプラチン投与後2日目より認められ、抗炎症性サイトカインであるIL10やIL27の発現量はそれに引き続いて上昇することを明らかにした。従って、シスプラチンによる腎障害時には炎症システムと抗炎症システムが順次活性化されることが示唆された。

さらに、シスプラチンを複数回投与することにより、腎臓の線維化マーカーであるalpha-SMA発現量が経時的に上昇することが示され、シスプラチンの繰り返し曝露は腎障害を不可逆的な状態へ移行されることが示された。また、この線維化については、増殖因子の過剰発現や血管内皮の再生遅延に起因することを見出した。

一方で、シスプラチン投与後に認められたIL-27が腎臓内で抗炎症作用を有すると想定し、シスプラチン投与に際してIL-27を投与し、炎症が抑制できるかを評価した。その結果、IL-27の投与は腎臓内の炎症を抑制するには至らず、IL-27の腎臓内における役割を示すことができなかった。今後は、IL-10やIL-35に着目した解析をさらに行う予定である。

(3) 網羅的解析を用いたリバーストランスレーショナルリサーチ

上記のように、薬剤性腎障害時における腎臓内での分子挙動を明らかにすることができたが、このことに加えて、薬物によらない慢性腎臓病の分子的特徴を把握することも重要と考え検討を行った。慢性腎臓病患者の腎組織からmRNAを抽出し、マイクロアレイを用いて、遺伝子発現情報を網羅的に解析した。さらに、疾患および病理的な特徴との比

較を行ったところ、腎臓内での炎症および線維化に関わる5つの遺伝子(HAVCR1、LCN2、WFDC2、SOX9、NKX6-2)を同定するに至った。これらの遺伝子のうち、HAVCR1、LCN2およびWFDC2については、腎障害時に腎臓内での発現が上昇することがすでに他の研究報告において示されている。従って、本研究により得られた結果の再現性および妥当性が示唆された。また、これらの分子は慢性腎臓病の診断に用いるためのバイオマーカーや疾患治療のターゲットとなり得ることが考えられる。今後は、薬剤性の腎炎や腎線維化における挙動に着目して解析を行う予定である。

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3件)

Nakagawa S, Omura T, Yonezawa A, Yano I, Nakagawa T, Matsubara K: Extracellular nucleotides from dying cells act as molecular signals to promote wound repair in renal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 307(12) 2014: F1404-1411.

Kikuchi O, Ohashi S, Nakai Y, Nakagawa S, Matsuoka K, Kobunai T, Takechi T, Amanuma Y, Yoshioka M, Ida T, Yamamoto Y, Okuno Y, Miyamoto S, Nakagawa H, Matsubara K, Chiba T, Muto M: Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression. *Am J Cancer Res*, 5(8) 2015: 2431-2440.

Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, Shinke H, Tomita E, Kajiwaru M, Matsubara T, Iehara N, Igarashi Y, Yamada H, Fukatsu A, Yanagita M, Matsubara K, Masuda S: Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease. *PLoS ONE*, 10(8) 2015: e0136994.

[学会発表](計3件)

中川俊作、米澤淳、松原和夫：薬剤性腎障害発現機構、日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2015 (2015. 3. 14、神戸)

竹澤亮、中川俊作、高尾翔太、米澤淳、中川貴之、松原和夫：シスプラチン誘発性尿細管障害に伴うPdgfシグナル伝達経路を介した血管障害および炎症進展機序の解明、第9回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2015. 11. 7、千葉)

中村美紗子、中川俊作、奥田有紀、新家遥、米澤淳、中川貴之、松原和夫：ペメトレキセドとカルボプラチン併用による進行性の腎機能低下、日本臨床腫瘍薬学

会学術大会 2016 (2016.3.12、鹿児島)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 俊作 (Nakagawa Shunsaku)

京都大学・医学部附属病院薬剤部・特定助教

研究者番号：50721916