

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06783

研究課題名(和文)薬物誘発性腎線維化に対する治療法の探索

研究課題名(英文)Development of therapeutic strategy for drug-induced renal fibrosis

研究代表者

中川 俊作(Nakagawa, Shunsaku)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50721916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物による腎障害は、一時的に腎機能を低下させるだけでなく、慢性的な腎機能低下につながることもある。また、腎機能の低下は、治療に必要とする薬剤の選択肢を狭めるため、腎障害を事後に解消するような方策の開発が重要と考えられる。本研究では、薬剤によって惹起された腎線維化の治療方法提示を最終目標とし、検討を行った。初めに、ヒト及び動物モデルにおける遺伝子発現情報を公開データベースより収集し、ヒト及び動物モデルに共通して線維化と関連する遺伝子を同定した。続いて、注目した遺伝子は複数の動物モデルにおいて発現が亢進することを確認した。従って、この遺伝子は腎線維化抑制にあたって治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床において、薬物による腎障害の頻度は少なくない一方で、その治療法は未だ確立されていない。特に、腎障害後に慢性的に腎機能が低下した際には、それを可逆的に回復させることは困難である。本研究では、薬剤による腎線維化に注目し、腎線維化進展の機序解明とそれに基づく治療標的の提示を目指した。その結果、慢性腎臓病患者および腎疾患モデル動物の腎臓において発現が亢進し、線維化促進に關与する遺伝子を見出した。この結果は、将来的に、薬剤性腎障害後の腎機能を回復させる手法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced nephropathy can lead to not only acute kidney injury but also chronic renal dysfunction. In addition, the decline in renal function narrows down the choice of drugs needed for treatment, so it is important to develop therapeutic strategies that can eliminate renal damage. In this study, we aimed to provide a concept of treatment for drug-induced renal fibrosis. First, gene expression data in human and animal models of kidney diseases was collected from public databases, and genes commonly associated with fibrosis in human and animal models were identified. Then, we confirmed that the genes of interest were up-regulated in several animal models. Therefore, this gene may be a therapeutic target for the suppression of renal fibrosis.

研究分野：医療薬学、腎臓学、薬剤疫学

キーワード：腎線維化 シスプラチン アリストロキア酸 SOX9 近位尿細管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物が腎臓に及ぼす影響は短期間での変化に注目されることが一般的であり、腎毒性薬物を用いた治療が腎機能の長期予後に及ぼす実態はほとんど明らかになっていない。一方、腎臓の尿細管上皮における細胞死は慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease, CKD)の起点となることが明らかにされている(Grgic I, et al. *Kidney Int.* 2012; 82: 172-183)。このことから、尿細管障害を引き起こすような薬物についてはCKDの原因になることが示唆され、臨床における実態解明と治療法の整備が必要と考えられる。

がん薬物療法が発達した現在においても、白金系抗がん薬シスプラチンは临床上重要な役割を担っている。一方で、シスプラチンは尿細管上皮細胞の障害を介して急性腎障害 (Acute Kidney Injury, AKI)を惹起することがよく知られているが、シスプラチンが腎臓に及ぼす長期的な影響については知見が乏しい。そこで申請者は、シスプラチン投与前に腎機能が正常であったがん患者について投与後における腎機能の変化を調べたところ、中等度以上のCKDステージに相当する慢性的な腎機能低下をきたす症例が少なくないことを示した。さらに、この変化の程度には、シスプラチンの投与量や投回数ではなく、シスプラチン初回投与後におけるAKIの発現が強い因子となることを明らかにした。すなわち、シスプラチンによるAKIの発現はCKDの進展につながることを示唆された。一方、临床上認められるシスプラチン誘発性のAKIは軽微なことが多いことから、シスプラチンによる慢性的な腎機能低下を解消するためには、AKIの予防を行うのではなく、低下した腎機能の回復を目指すことが有効と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、以下に示す事項を具体的な目的とした。

- ・薬剤性腎障害のモデル動物を用いて腎障害発症後における線維芽細胞の機能変化を明らかにする。
- ・腎臓を構成する細胞の初代培養系を用いて治療標的の候補となる分子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 線維芽細胞の機能変化に注目したシスプラチンおよびアリストロキア酸腎症の病態解明

薬物トランスポータの一つである Multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 はシスプラチンの腎臓への蓄積に関与しており、MATE1 遺伝子の働きが欠損したマウス(MATE1 KO マウス)では、野生型マウスと比較してシスプラチンによる腎障害が重篤になることが示されている(Yonezawa A and Inui K. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 563-568)。そこで、MATE1 KO マウスおよび野生型マウスに対してシスプラチンを投与し、投与後における病態の変化を比較した。また、腎近位尿細管上皮細胞のアポトーシス、腎線維化及び慢性的な腎機能低下を惹起する腎毒性薬物である Aristolochic acid (AA) を用いた検討を加えた。

#### 3-2. 慢性腎臓病患者および腎障害のモデル動物に関する遺伝子発現プロファイルの取得と線維化に関わる遺伝子の同定

NCBI Gene expression omnibus へ登録されている慢性腎臓病患者および薬剤性腎障害モデル動物の腎臓における遺伝子発現データを取得した。関連する既報において、線維化の重篤度が示されている場合は、その重篤度と遺伝子発現プロファイルを比較し、腎線維化に関連する遺伝子のうち、慢性腎臓病患者とモデル動物に共通したものを探索した。

#### 3-3. 近位尿細管上皮細胞初代培養系を用いた検討

既報を参考に C57BL/6J 系雄性マウス(7週齢)の腎皮質より近位尿細管上皮細胞を単離した。単離した細胞は、1% インスリン・トランスフェリン・セレンウム及び 49.6 nM ヒドロコルチゾンを含む DMEM/F-12 培地で、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37 °C の環境下で培養した。細胞外基質産生を促す Transforming growth factor-beta 1 (Tgf-β1)、*mouse Sox9* に対する siRNA (siSox9) または negative control siRNA を初代培養細胞に処置し、処置開始から 48 時間後における *α-SMA* 及び *Colla1* mRNA の発現量を real-time PCR 法により調べた。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 線維芽細胞の機能変化に注目したシスプラチンおよびアリストロキア酸腎症の病態解明

初めに、MATE1 KO マウスにシスプラチンを投与し、血漿クレアチニンを腎機能の指標として腎機能の時間変化を調べた。その結果、野生型マウスの腎機能に対して影響を及ぼさず、MATE1 KO マウスでは AKI を引き起こす投与量を見出した。また、このように惹起された MATE1 KO マウスの AKI は回復せず遷延することを示した。一方で、このシスプラチンによる AKI は尿細管間質における線維芽細胞の増殖を伴うことも見出し、シスプラチンによる慢性的な腎機能低下には腎線維化が関与すると考えられた。さらに、シスプラチン投与後における腎線維化の進展に伴って、腎臓におけるエリスロポエチンの発現量およびヘマトクリット値が低下し、腎性貧血が

惹起されていることが確認された。

また、マウスに対してアリストロキア酸を繰り返し投与した結果、投与開始後 42 日目における血清クレアチニン値は、アリストロキア酸投与前と比較して、有意に上昇した。また、腎線維化のマーカー分子である  $\alpha$ -SMA タンパク質及び *Colla1* mRNA の発現量はアリストロキア酸投与開始後 42 日目において、投与前と比較して有意に上昇することが観察された。

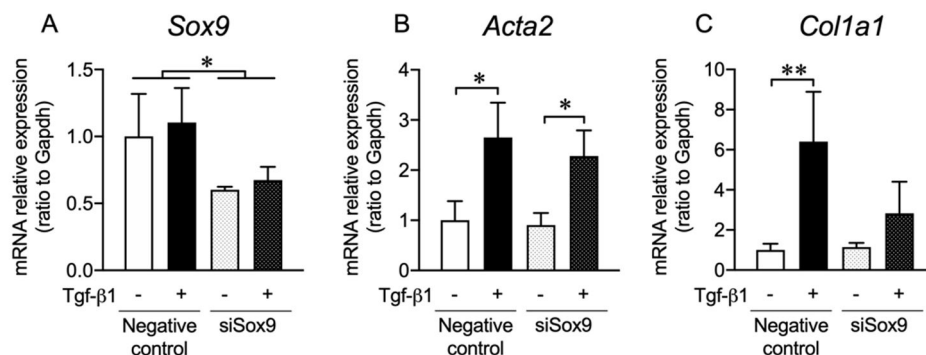
以上より、薬剤性腎障害の動物モデルにおいて尿管障害は腎線維化を伴うことが確認された。

#### 4 - 2 . 慢性腎臓病患者および腎障害のモデル動物に関する遺伝子発現プロファイルの取得と線維化に関わる遺伝子の同定

NCBI Gene expression omnibus へ登録されている慢性腎臓病患者および薬剤性腎障害モデル動物の腎臓における遺伝子発現データを取得し、腎線維化に関連する遺伝子を探索した結果、候補遺伝子として *SRY-BOX Transcription factor 9 (SOX9)* を見出した。また、*Sox9* はシスプラチン腎症およびアリストロキア酸腎症のモデル動物腎臓においても発現亢進が認められた。

#### 4 - 3 . 近位尿管上皮細胞初代培養系を用いた検討

以上までの検討において、腎障害に伴って近位尿管上皮細胞における *Sox9* 発現量が増加すること、及び、*Sox9* は腎線維化や腎機能低下の進展に関与する可能性が考えられた。そこで、近位尿管上皮細胞における *Sox9* の発現と線維化との関わりを明らかにするため、近位尿管上皮細胞初代培養系を用いて Tgf- $\beta$ 1 存在下における線維化マーカー分子の発現量を調べた。*Sox9* に対する siRNA を処置した細胞では、negative control siRNA を処置した細胞と比較して、*Sox9* mRNA の発現量が有意に低下した (Figure 1)。また、細胞に対して Tgf- $\beta$ 1 を処置することにより線維化マーカー分子 *Acta2* 及び *Colla1* の mRNA 発現量は有意に増加したが (Figure 1B, C) *Sox9* mRNA 発現量への影響は認められなかった。一方、*Sox9* に対する siRNA を処置した細胞では、negative control siRNA を処置した細胞と比較して、*Colla1* の発現量に対する Tgf- $\beta$ 1 の効果が減弱した (Figure 1C)。



**Figure 1. Effect of siRNA targeting mouse *Sox9* (siSox9) on transforming growth factor- $\beta$ 1 (Tgf- $\beta$ 1)-induced up-regulation of profibrotic factors in renal tubular epithelial cells.** Primary cultures of renal proximal tubular epithelial cells were treated with Tgf- $\beta$ 1 and siSox9 or negative control siRNA (Negative control) for 48 hours. *Sox9*, *Acta2*, *Colla1* mRNA expression levels were assessed by real-time PCR analysis (n = 3). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

以上より、*Sox9* は薬剤性腎障害において、尿管障害と線維化進展を結ぶ新規分子であること、腎機能の回復を目指すにあたって治療標的となることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katada Y, Nakagawa S, Nishimura A, Sato YK, Taue H, Matsumura K, Yamazaki K, Minakata K, Yano I, Omura T, Imai S, Yonezawa A, Sato Y, Nakagawa T, Minatoya K, Matsubara K.	4. 巻 75
2. 論文標題 Effects of fasting on warfarin sensitivity index in patients undergoing cardiovascular surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Clin Pharmacol	6. 最初と最後の頁 561-568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00228-018-2592-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Y, Yonezawa A, Nakagawa S, Imai S, Denda M, Omura T, Nakagawa T, Matsubara K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Cisplatin, rather than oxaliplatin, increases paracellular permeability of LLC-PK1 cells via activating protein kinase C.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2019.09.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa S, Nakaishi M, Hashimoto M, Ito H, Yamamoto W, Nakashima R, Tanaka M, Fujii T, Omura T, Imai S, Nakagawa T, Yonezawa A, Imai H, Mimori T, Matsubara K	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of medication adherence on disease activity among Japanese patients with rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0206943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0206943.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikuta K, Nakagawa S, Momo K, Yonezawa A, Itohara K, Sato Y, Imai S, Nakagawa T, Matsubara K	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of proton pump inhibitors and concomitant drugs with risk of acute kidney injury: a nested case-control study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e041543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2020-041543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kondo M, Nakagawa S, Orii S, Itohara K, Sugimoto M, Omura T, Sato Y, Imai S, Yonezawa A, Nakagawa T, Matsubara K	4. 巻 43
2. 論文標題 Association of initial trough concentrations of vancomycin with outcomes in pediatric patients with gram-positive bacterial infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1463-1468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-01003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗村万由子、中川俊作、佐藤夕紀、大村友博、今井哲司、米澤 淳、中川貴之、松原和夫
2. 発表標題 腎尿管上皮と線維芽細胞の相互作用におけるTMPRSS4の関与
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川俊作、米澤淳、柳田素子、武藤学、松原和夫
2. 発表標題 腎機能低下患者を対象とした抗がん薬の臨床薬理研究
3. 学会等名 第14回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川俊作
2. 発表標題 薬剤性腎障害の基礎と臨床
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------