

平成22年5月21日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009年度
 課題番号：20790133
 研究課題名（和文） 尿細管セグメントの網羅的遺伝子発現解析によるシスプラチン腎症規定因子の同定
 研究課題名（英文） IDENTIFICATION OF KEY FACTORS IN CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY BY MICROARRAY ANALYSIS USING THE ISOLATED RENAL TUBULES
 研究代表者
 米澤 淳（YONEZAWA ATSUSHI）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90452341

研究成果の概要（和文）：

腎臓は様々な小器官から成る臓器である。そこで、シスプラチン腎症起点部位である尿細管を単離してマイクロアレイ解析を行い、腎毒性発現に関与する遺伝子の探索を行った。まず、本手法の妥当性を検証し、尿細管の遺伝子発現を反映することを確認した。さらに、病態モデルラットの単離尿細管を用いて解析を行ったところ、ケモカイン類の顕著な発現上昇が認められた。以上より、ケモカイン類が尿細管におけるシスプラチン腎毒性発現の規定因子となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Kidney consists of several renal segments. To clarify the gene expression profile in the renal tubule, which is the origin of cisplatin-induced nephrotoxicity, microarray analysis using the isolated tubules was carried out. At first, we confirmed that this experimental method reflected the tubular gene expression. In the isolated tubules of cisplatin-treated rats, the gene expression of chemokines was elevated. Chemokines are suggested to be the key factors of the renal tubular genes in cisplatin-induced nephrotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医 薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学、薬学、マイクロアレイ、トランスポータ、腎臓、シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

腎臓は最小機能単位ネフロンの集合体であり、ネフロンは糸球体、近位尿細管、ヘン

レ係蹄、遠位尿細管、集合管などの機能分節より構成され、それぞれ固有の構造・機能に関わる多様な遺伝子群の発現が認められる。

腎障害は糸球体起点、尿細管起点、血流減少など様々な素因に対して現れる GFR 低下を呈する病態の総称として位置づけられている。しかし、腎障害発現機構として検討される項目の多くは腎全体 (whole kidney) における遺伝子発現解析であり、腎臓内の細胞間情報伝達機構を考慮していない。すなわち、腎保護法の考案および尿細管機能のマーカー探索には個々の病態の起点部位における規定因子の同定が必要である。

2. 研究の目的

薬剤性腎障害発現に関与する遺伝子はいくつか報告されているが、薬物が尿細管障害を誘発し GFR 低下へと導く細胞間情報伝達機構に関する知見は皆無である。すなわち、whole kidney を用いた検討ではヘテロな細胞集団である腎組織の病変進展を個々に解析・評価できないこと、株化された尿細管上皮細胞はゲノム情報に乏しいイヌ、ブタ、フクロネズミ由来のものしか樹立されていないことから、尿細管特異的な遺伝子発現解析の技術が未確立であり、ヘテロな細胞集団での情報伝達分子の同定に至っていないと考えられる。本課題ではラット腎臓より実体顕微鏡下で形態的特徴より高純度な近位尿細管を単離して網羅的遺伝子発現解析を行うことで、薬剤性尿細管障害から GFR 低下へと伝播する近位尿細管由来の腎病変進展関連遺伝子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 単離尿細管を用いた遺伝子発現プロファイルの構築と評価

ラット腎臓より近位尿細管を単離し total RNA を抽出後、T7 配列連結オリゴ dT プライマーを用い逆転写反応により鋳型 cRNA を作成した。DNA アレイ解析には従来の蛍光検出系より感度の高い化学発光検出系を特徴とする ABI 社 Rat Genome Survey Microarray® を用い、尿細管遺伝子発現プロファイルを構築した。

(2) 腎機能障害モデルラットを用いた尿細管遺伝子発現プロファイルの構築

シスプラチン 2 mg/kg の投与により尿細管障害モデルを 10 mg/kg 投与により GFR 低下モデルを作成できることを既に示しており、これらの腎障害モデルを用いて単離尿細管遺伝子プロファイルを作成した。

(3) 腎病態モデルの尿細管遺伝子発現プロファイルを用いたメディエーター候補遺伝子の探索

発現上昇した遺伝子を生物学的パスウェ

イナビゲーション (Pathway Studio®) を用いて機能的関連遺伝子に分類し変動遺伝子群を特定した。炎症反応では起点となる一因子とそれに関連する複数の分子が同時に機能するため、まずメディエーター関連群を特定することがその上流にある規定因子の探索に有効であると考えられる。そこで、その遺伝子群の中から個々の分子機能特性の情報を基にメディエーター候補遺伝子を決定した。

(4) ヒト OCT, MATE 安定発現 MDCK 細胞の構築

それぞれ異なる抗生物質耐性を示すベクターに挿入したヒト OCT2 (G418 耐性) および MATE1, 2-K (ハイグロマイシン耐性) を、有機カチオン輸送系を有さない極性細胞であるイヌ腎由来 MDCK 細胞にリポフェクション法により導入した。細胞を 2 種の抗生物質含有培地中で 10-14 日間培養することで、抗生物質耐性細胞を抽出した。さらに、耐性細胞をクローン化後に細胞形態、mRNA 発現及び典型的基質であるテトラエチルアンモニウム TEA の取り込み活性を調べ、安定発現細胞株を選択した。

(5) ヒトにおけるカチオン性薬物メトホルミンの尿細管分泌能の評価

京都大学医学部附属病院糖尿病栄養内科に入院中で 5 日以上 (定常状態) メトホルミン服用中の患者において、服用前、服用後 4 時間、9 時間に採血し、HPLC 法によりメトホルミン血中濃度測定を行った。また、余剰分の血液よりゲノム DNA を抽出しダイレクトシーケンシング法により OCT2、MATE1 および MATE2-K 遺伝子の SNP を検索した。加えて、カルテ調査による患者背景 (併用薬、生化学的検査値、副作用など) の情報収集を行った。

4. 研究成果

研究計画初年度である平成 20 年度は腎障害モデル動物として、2mg/kg シスプラチンを投与した尿細管障害モデルおよび 10mg/kg シスプラチンを投与した GFR 低下モデルを作製し、腎機能の評価を行った。さらに、これらモデルラット腎臓より近位尿細管を単離してマイクロアレイ解析を行い、尿細管遺伝子発現プロファイルを構築した。研究計画最終年度である平成 21 年度には、2mg/kg シスプラチンを投与した尿細管障害モデルおよび 10mg/kg シスプラチンを投与した GFR 低下モデルにおいて、単離尿細管のマイクロアレイ解析を行った。その結果、尿細管においてシスプラチンによるケモカイン類の特徴的な発現上昇が認められ、当研究室で以前に行った慢性腎不全モデルとは遺伝子発現プロフ

ファイルが大きく異なることが判明した。また、臨床的シスプラチン腎症モデルである 5mg/kg シスプラチン投与ラットにおいて、腎障害の進行に対応した経日的な各種ケモカイン類の発現上昇が認められた。以上より、シスプラチン腎症においてケモカイン類が尿細管上皮細胞由来の炎症因子である可能性が示された。

正常及び慢性腎不全モデル動物の腎 mRNA 発現データベースを用いた *in silico* データ解析により新規トランスポート候補遺伝子を抽出した。さらに、siRNA を用いた機能解析を行い新規リボフラビントランスポート RFT1 の同定に成功した。哺乳類でリボフラビントランスポートの分子実体はこれまで明らかにされておらず、RFT1 の同定によりリボフラビンの恒常性に関する分子機構の解明とリボフラビン欠損症の病態生理機構の解明につながると期待される。

ヒト尿細管上皮細胞モデルが確立されておらず、*in vitro* での腎排泄能の予測は困難であった。今回、ヒト有機カチオン輸送系 OCT2/MATE1 を発現させたダブルトランスフェクタントを構築した。これにより、培養細胞を用いたカチオン性薬物の経細胞輸送の評価が可能となった。さらに、白金系抗がん剤の中で唯一オキサリプラチンが、幅広い組織分布を示す有機カチオン輸送系 OCT3 に輸送されることを明らかにした。この成果は、オキサリプラチンの大腸がんに対する効果発現という特徴的な薬理作用を考える上で重要な情報になると考えられる。

さらに、ヒトにおいてメトホルミンの排泄能を指標として、尿細管機能を評価した。その結果、メトホルミンの分泌はクレアチニンクリアランスと良好な相関が認められた。一方、有機カチオン輸送系 OCT2、MATE1、MATE2-K のヘテロの変異や他の臨床検査値との関連は観察されなかった。しかし、本症例では腎障害患者は含まれていない。このことから、少なくとも腎機能が比較的よい状態の患者群では、クレアチニンクリアランスがカチオン性薬物の尿細管分泌能の指標になると考えられる。

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)

- (1) Toyama K, Yonezawa A Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on

the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet Genomics*. 20(2): 135-138, 2010 査読有

- (2) Sato T, Masuda S, Yonezawa A, Tanihara Y, Katsura T, Inui K. Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. *Biochem Pharmacol*. 76(7): 894-903, 2008 査読有

- (3) Yonezawa A Masuda S, Katsura T, Inui K. Identification and Functional Characterization of a Novel Human and Rat Riboflavin Transporter, RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295(3): C632-641, 2008 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 小澤 愛子 単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析：シスプラチン腎症増悪を反映する分子の探索、日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日 岡山

- (2) Yoshiaki Yao. Comparative functional characteristics of novel human riboflavin transporter, hRFT1 and hRFT2. 24th JSSX Annual Meeting, Nov 27, 2009 Kyoto, Japan

- (3) Kana Toyama. Effect of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) polymorphisms on the disposition of metformin. 24th JSSX Annual Meeting, Nov 27, 2009 Kyoto, Japan

- (4) 米澤 淳 腎 mRNA 発現データベースを活用した新規リボフラビントランスポート RFT1 の同定、シンポジウム「尿細管輸送体調節と疾病」、第 52 回日本腎臓学会学術総会 2009 年 6 月 4 日 横浜

- (5) Atsushi Yonezawa. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NOVEL MAMMALIAN RIBOFLAVIN TRANSPORTER RFT1. 3rd Asian Pacific Regional ISSX Meeting, May 10, 2009 Bangkok, Thai

- (6) 遠山佳奈 腎排泄型カチオン性薬物メトホルミンのクリアランス予測因子の探索、日本薬剤学会第 24 年会 2009 年 5 月 21 日 静岡

* ~ ~ ~
けるメトホルミンとシメチジンの薬物間
相互作用機構の解明、第 129 回日本薬学
~ 会年会 2009 年 3 月 26 日 京都 ~
(8) Atsushi Yonezawa. IDENTIFICATION OF
HUMAN AND RAT NOVEL RIBOFLAVIN
TRANSPORTER RFT1 BASED ON THE IN SILICO
GENE EXPRESSION DATABASE. 日本薬物動態学会
第 23 回年会 2008 年 10 月 30 熊 ~

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 淳 (YONEZAWA ATSUSHI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：90452341