

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390048

研究課題名（和文）尿毒症物質の代謝・産生阻害を基軸とする腎障害進展阻止薬の新規創薬ストラテジー

研究課題名（英文）Novel strategy for development of suppressive drugs for kidney disease based on inhibition of metabolic production of uremic toxins

研究代表者

齋藤 秀之 (SAITO HIDEYUKI)

熊本大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40225727

研究成果の概要（和文）：腎機能障害・腎不全の病態進展並びに付随する尿毒症に関わる硫酸配合型尿毒症物質インドキシル硫酸（IS）に焦点をあて、肝 IS 産生阻害物質を探索することを目的とした。IS 産生阻害物質スクリーニング系を用いて調べた結果、ポリフェノール系薬物が強い IS 産生阻害を示した。IS 産生阻害薬の投与により、急性腎障害の発現・進展が抑制されることを見出し、腎障害治療法の新規創薬ストラテジーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to explore inhibitors of hepatic production of indoxyl sulfate based on uremic toxins which are involved in renal dysfunction and kidney injury with uremia. By using the screening system for indoxyl sulfate production inhibitors, we found that polyphenolic compounds had potent inhibitory effects on hepatic indoxyl sulfate production. Administration of these polyphenols to rats with acute kidney injury ameliorated the disturbed renal function, suggesting that these approaches could be a useful strategy to develop therapeutic drugs for kidney injuries and/or diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：腎臓薬理学、薬物毒性学、薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：急性腎障害、慢性腎不全、尿毒症物質、腎尿細管

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における腎疾患患者は年々増加しており、国民の死因の第8位を占め、平成18年末には約26万人が透析療法を受けるなど、国民の健康に重大な影響を及ぼしている。特に、腎機能低下が長期にわたり進行する慢性腎臓病（CKD）は、発症・進展に生活習慣が密接に関わっており、生活習慣の改善や薬物療法等によって進行予防が可能な疾

患となってきている。CKD 対策の重要性は徐々に普及しつつあり、医療現場に適切な予防・治療法を普及させることにより、腎疾患の発症・進展予防対策を強化することが喫緊の課題とされている。腎機能障害の進行防止のためには、血糖・血圧等の適正管理のほか、アンジオテンシン変換酵素阻害薬・アンジオテンシン受容体阻害薬等による薬物療法や、塩分・蛋白の摂取制限等の食事療法が行われ

ている。これらの治療によっても腎機能障害が重症化し末期腎不全に至る場合には、腹膜透析、血液透析等の人工透析療法や腎移植が行われている。従って、腎障害の重症化を防止し、慢性腎不全による透析導入への進行を阻止して透析導入患者を減少させること、さらにCKDに伴う心血管系疾患の発症を抑制することが、国策のひとつとして目標にあげられている。腎機能低下が重症化したCKDには根本的な治療方法がなく、腎代替療法としては、血液透析、腹膜透析及び腎移植しか有効な対処法がない。このため腎不全の進行を抑制することが重要であり、有効かつ安全な腎不全治療薬の開発が望まれている。これまで、腎不全の治療薬としては、腸管内で毒素物質を吸着させて腎臓の負担を軽減し、腎不全の発症又は進行を抑制する経口活性炭吸着剤（AST-120、商品名：クレメジン®）が用いられている。しかしながら、この種の経口治療剤や低タンパク食は、大量服用する必要がある他、吸着特異性を有していない等の実用上の問題が多々指摘されている。国外において、CKDにおける尿毒症物質の病態生理学的な重要性についてはVanholder等のCKD専門研究者により提示されているが治療薬ターゲットとしての可能性に着眼した研究事例・報告は未だみられない。

## 2. 研究の目的

非ステロイド系消炎鎮痛薬や抗がん薬等の薬物投与に伴って頻発する急性腎障害は、薬物治療上の副作用問題として顕在化しており、より有効かつ安全な未然防止・治療対策が喫緊課題となっている。また、直近では腎機能低下が長期にわたり進行する慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease (CKD)）が、脳血管疾患や心筋梗塞等の循環器系疾患の発症リスク要因として注視されており（図1）、適切な予防・治療策の早急な確立が求められている。急性・慢性を問わず腎不全に伴う尿細管機能障害時には、腎臓固有の薬物・毒物の尿中排泄機能（腎特異的薬物トランスポータ機能）が障害される結果、尿毒症物質が血液や組織中に高濃度に蓄積し、循環器系等を含む種々の生理機能に影響を及ぼすことが示唆されている。すなわち、腎障害に伴い蓄積される尿毒症物質は、正常な組織機能の破綻を誘起する重要病態進展因子として認識されつつある。本研究計画では、新たな創薬領域として尿毒症物質の代謝・産生を抑制する化合物の探索に取り組み、腎機能障害の重症化・進行の阻止並びに付随して発生する心血管系イベントを予防・軽減し得る薬物のスクリーニング系を構築するとともに、候補治療薬となるシーズ創出を目的として企図・立案するものである。

## 3. 研究の方法

急性腎障害並びに慢性腎不全時に伴い血液・組織中に蓄積する尿毒症物質インドキシル硫酸（有機アニオン性化合物）に焦点をあて、腎障害・腎機能低下におけるインドキシル硫酸の病態生理学的役割の究明、代謝・産生・排泄にかかわる酵素・トランスポータ群の同定、インドキシル硫酸産生阻害薬物のスクリーニングと腎障害進展予防効果並びに安全性について包括的研究を展開した。インドキシル硫酸の代謝・産生評価系を構築し、前駆物質インドールを出発物質とした代謝経路及び変換効率等を精査し、評価系の妥当性について検証・評価する。得られた結果を踏まえ、臨床使用可能な既存薬物もしくは候補化合物群の中から、インドキシル硫酸の産生経路を遮断・阻害する薬物もしくは化合物を選別し、動物並びに培養細胞モデル系を用いた系統的なスクリーニングを並行実施しながら、腎障害進展阻止を企図した評価ストラテジーの基盤確立とそれに基づく候補薬物の絞り込みを行った。薬剤性または虚血再灌流急性腎障害モデル動物並びに慢性腎臓病モデル動物を用い、スクリーニングで絞られたインドキシル硫酸産生阻害薬物のin vivoにおける腎障害進展の抑制効果、安全性・有害反応等についてデータを収集した。

（1）腎機能並びに薬物代謝酵素及びトランスポータ発現に及ぼすインドキシル硫酸の影響

これまでの研究から、薬剤（抗がん薬シスプラチン）誘発性の急性腎障害及び虚血再灌流急性腎障害時において、血清クレアチニンと相関して血清中並びに腎組織中のインドキシル硫酸濃度が著明に上昇すること、腎障害進展因子として寄与する可能性が示唆された。本検討では、インドキシル硫酸による腎障害の誘発・進展作用の有無、並びに肝薬物代謝酵素、腎薬物トランスポータの発現変動についてラットを用いた精査を行った。

①SD系雄性ラット（200-300g）に前駆物質であるインドールを経口投与もしくは腹腔内投与（50-200 mg/kg）し、経時的に血清並びに腎及び肝組織中のインドキシル硫酸蓄積量を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）にて測定した。

②インドール投与後、腎機能マーカー（血清クレアチニン、血清尿素窒素（BUN））及び血清電解質濃度（Na, K, Cl）を検査する。同時に肝機能マーカー（AST, ALT）についても測定を行った。

③腎及び肝組織の病理検査（主にヘマトキシリン-エオシン（HE）染色）を行い、インドール投与及びインドキシル硫酸の蓄積に付随する組織学的変化について精査した。

④in vitro インドキシル硫酸産生・評価モ

デルの作成並びに阻害薬物の網羅的探索を行った。ラット肝組織並びに培養細胞系を用い、インドキシル硫酸の *in vitro* 代謝・産生系を新たに構築し、インドキシル硫酸阻害薬スクリーニング・評価系を開発した。ラット肝 S9 画分によるインドキシル硫酸産生系を確立した。ラット肝臓より遠沈・分離により S9 画分を精製し、インドール添加に伴うインドキシル硫酸の代謝産生システムを確立した。

(2) 急性腎不全ラットにおけるインドキシル硫酸産生阻害薬の腎機能保護効果の検証

①インドキシル硫酸産生阻害薬について、既に当研究室で確立した虚血再灌流急性腎障害モデルラットを用いた投与実験を行い、腎機能障害の進展阻止効果について精査した。評価の測定対象として、血清中インドキシル硫酸濃度、肝・腎組織中インドキシル硫酸濃度、腎機能マーカー(血清クレアチニン、血清尿素窒素)、血清電解質濃度(Na、K、Cl)、尿細管障害分子 Kim-1、抗酸化ストレス因子 Nrf2 を測定した。特に、インドキシル硫酸産生阻害薬の投与方法(経口、静注、腹腔内等)投与量、投与間隔等の投与設定と腎機能との関連について綿密な検討を行った。同時に、血清中インドキシル硫酸濃度について測定し、当該阻害薬の効果について評価・判定した。統計処理は、血液生化学データ並びに mRNA 発現量の変化については、One-way analysis of variance (ANOVA) を用いた後、Scheffe's F test を行い有意差判定した。3 群間以上の比較検定は Scheffe's multiple comparison test を用いて行い、危険率  $P < 0.05$  を有意差基準とした。パラメータ間の相関関係は Pearson's correlation coefficient test を用いて行い、危険率  $P < 0.05$  を有意差基準とした。

#### 4. 研究成果

本研究では、腎障害進展因子である IS の産生を阻害する新規物質を発見するために、ラット肝 S9 画分を用いたスクリーニング評価系を新たに確立し、Cisplatin 誘発急性腎障害ラットに IS 肝産生阻害物質を経口投与することでその効果を検証した。また、IS と急性腎障害との関連性を調べるために Indole 食餌による Cisplatin 誘発急性腎障害への影響について加えて検討を行った。

(1) ラット肝 S9 画分を用いた Indole 添加 IS 産生 *in vitro* 系を新たに作製し、IS 産生速度における見かけの  $K_m$  値及び  $V_{max}$  値は、それぞれ  $27.1 \mu M$  及び  $30.5 \text{ pmol/min/mg protein}$  (Eadie-Hofstee plots) であった。

(2) 10 種類の化合物を用いた新規 IS 産生阻害物質のスクリーニング評価を行い、SULT の阻害物質で強い IS 産生阻害を認め、

Quercetin、Curcumin、Resveratrol 及び DCNP の拮抗阻害における見かけの  $K_i$  値は、それぞれ  $1.0 \mu M$ 、 $1.8 \mu M$ 、 $1.5 \mu M$  及び  $0.08 \mu M$  であった。一方、CYP2A6 及び CYP2E1 の阻害物質においては、IS 産生阻害がほとんど認められなかった。

(3) Cisplatin 誘発急性腎障害ラットに IS 肝産生阻害物質である Quercetin を経口投与した結果、血清及び腎臓中 IS 濃度が減少し、SCr、BUN、腎尿細管組織学的検査及び腎 rKim-1 タンパク質発現量において、腎障害の軽減を認めた。Resveratrol 経口投与においては、血清及び腎臓中 IS 濃度が減少し、腎障害軽減傾向を認めた。一方で、Curcumin 経口投与においては、IS の減少並びに腎機能の改善が認められなかった。また、DCNP 経口投与においては血清及び腎臓中 IS 濃度減少を認めたが、SCr 及び BUN において更なる腎障害の増悪を認めた。

(4) Quercetin、Curcumin、Resveratrol 及び DCNP の経口投与は、血清及び腎臓中 Cisplatin 濃度に影響を与えないことを確認した。

(5) Cisplatin 誘発急性腎障害において、腎有機イオントランスポータ(rOat1、rOat3、rOat2)のタンパク質発現量が減少し、Quercetin を経口投与することで、その発現量減少が回復することを認めた。

(6) Indole 食餌によってラットの血漿中 IS 濃度を上昇させることはできたが、その際の Cisplatin 誘発急性腎障害において、SCr、BUN 及び腎 rKim-1 タンパク質発現量への影響は認められなかった。

(7) Cisplatin 誘発急性腎障害ラットに Quercetin を経口投与することで、腎障害が軽減した。Quercetin は過去に抗酸化作用も報告されていることから、抗酸化作用が一部腎障害軽減に寄与したと推測される。すなわち IS 肝産生阻害及び抗酸化作用により、腎機能が改善し、IS の排泄が増加する。そのことで腎障害が軽減し、更に腎機能が改善する。このような腎機能改善サイクルにより、腎障害が改善されたと推測される。

(8) 虚血再灌流 AKI に伴った尿毒症物質の蓄積変動並びに AST-120(クレメジン)並びに SULT 阻害薬(resveratrol, quercetin)投与による尿毒症物質の蓄積抑制効果と腎保護作用について比較精査した結果、6 週齢 SD 系雄性ラットに対し腎虚血を 30 分行った後再灌流を行うことで、血清中及び臓器中 IS の著名な蓄積上昇を認めた。また、腎機能指標(SCr、BUN)や腎障害バイオマーカー(Kim-1、NGAL)の尿中排泄量の有意な上昇、組織内酸化ストレスの指標である Nrf2 の核内移行が促進されることを観察した。虚血再灌流 AKI ラットに対し AST-120 を経口投与した結果、血清中及び臓器中 IS の蓄積が減少すること、

SCr、BUN、Kim-1並びにNGALの尿中排泄量の有意な改善とともに、酸化ストレス防御因子の転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2) の核内移行が抑制されることが判明した。虚血再灌流 AKI ラットに対し SULT 阻害薬である resveratrol (5mg/kg) を経口投与した結果、血清中及び臓器中 IS の蓄積が減少すること、SCr、BUN 及び Kim-1 の尿中排泄量が有意に改善されること、Nrf2 の核内移行が抑制されることが示唆された。Quercetin (50mg/kg) の経口投与によっても同様の腎機能回復効果が観察された。

虚血再灌流 AKI ラットに対する AST-120 や SULT 阻害薬の効果から IS が腎機能障害進展に内因性リスク因子として関与する可能性が示され、この体内 IS 蓄積を抑えることが腎機能の維持に重要であることが示唆された。また、Nrf2 の核内移行が抑制されたことから、IS の蓄積抑制が腎組織内の酸化ストレス低減につながったと推察される。従って、IS 産生阻害作用並びに抗酸化ストレス作用を併せ持つ多能性薬物が見出されれば、虚血性 AKI の予防・改善に有効な薬物治療法が開発される可能性が示唆された。

以上、今回の知見により判明したポリフェノール系薬物をモデル化合物として、IS 肝産生阻害作用、抗酸化作用並びに非毒性を併せ持つ新規腎障害治療薬が開発されることにより、急性腎障害の軽減、進展抑制並びに心血管イベントの予防効果が期待される。本研究結果は、尿毒症物質インドキシル硫酸の肝産生阻害に基づく新規腎障害治療及び予防薬開発戦略に重要な基礎情報を提供するものになると考える。

#### 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 18 件、全て査読有)

- ① Kato T, Hamada A, Mori S, Saito H. Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012, in press.
- ② Iwata K, Aizawa K, Kamitsu S, Jingami S, Fukunaga E, Yoshida M, Yoshimura M, Hamada A, Saito H. Effects of Genetic Variants in SLC22A2 Organic Cation Transporter 2 and SLC47A1 Multidrug and Toxin Extrusion 1 Transporter on Cisplatin-induced Adverse Events. *Clin Exp Nephrol*. 2012, in press.
- ③ Kusumoto M, Kamobayashi H, Sato D, Komori M, Yoshimura M, Hamada A, Kohda Y, Tomita K, Saito H. Alleviation of cisplatin-induced acute kidney injury using phytochemical polyphenols is accompanied by reduced accumulation of indoxyl sulfate in rats. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15(6):820-830.
- ④ Iwata K, Aizawa K, Sakai S, Jingami S, Fukunaga E, Yoshida M, Hamada A, Saito H. The relationship between treatment time of gemcitabine and development of hematologic toxicity in cancer patients. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(11):1765-1768.
- ⑤ Yamakawa Y, Hamada A, Shuto T, Yuki M, Uchida T, Kai H, Kawaguchi T, Saito H. Pharmacokinetic impact of SLC01A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 90(1):157-163.  
<http://hdl.handle.net/2298/23261>
- ⑥ Yuki M, Yamakawa Y, Uchida T, Nambu T, Kawaguchi T, Hamada A, Saito H. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of nilotinib in human plasma. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(7):1126-1128.
- ⑦ Yamakawa Y, Hamada A, Nakashima R, Yuki M, Hirayama C, Kawaguchi T, Saito H. Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLC01B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Drug Monit*. 2011;33(2):244-250.
- ⑧ Nambu T, Hamada A, Nakashima R, Yuki M, Kawaguchi T, Mitsuya H, Saito H. Association of SLC01B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):114-119.
- ⑨ Saito H. Pathophysiological regulation of renal SLC22A organic ion transporters in acute kidney injury: pharmacological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010; 125(1):79-91. Review.  
<http://hdl.handle.net/2298/13109>
- ⑩ Nambu T, Araki N, Nakagawa A, Kuniyasu A, Kawaguchi T, Hamada A, Saito H. Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci*. 2010;101(1):137-142.

- ⑪ Maeda Y, Hamada A, Sanematsu E, Sasaki JI, Yokoo K, Hira A, Saito H. Co-administration of irinotecan decreases the plasma concentration of an active metabolite of amrubicin, amrubicinol in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(5):953-959.
- ⑫ Yokoo K, Murakami R, Matsuzaki T, Yoshitome K, Hamada A, Saito H. Enhanced renal accumulation of cisplatin via renal organic cation transporter deteriorates acute kidney injury in hypomagnesemic rats. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13(6):578-584. <http://hdl.handle.net/2298/15589>
- ⑬ Fujimoto H, Hicuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Tanoue N, Hamada A, Saito H. P-Glycoprotein mediates efflux transport of darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(9):1588-1593.
- ⑭ Mouri T, Inoue T, Nonoguchi H, Nakayama Y, Miyazaki H, Matsuzaki T, Saito H, Nakanishi T, Kohda Y, Tomita K. Acute and chronic metabolic acidosis interferes with aquaporin-2 translocation in the rat kidney collecting ducts. *Hypertens Res*. 2009;32(5):358-363.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 齋藤秀之, シンポジウム 20・受容体・トランスポーター研究の最前線: 抗悪性腫瘍薬の個別動態変動・毒性リスクとトランスポーター介在. 第 32 回 日本臨床薬理学会年会 (平成 23 年 12 月 1-3 日、浜松).
- ② Iwata K, et al., Genetic variation in the organic cation transporter 2 (OCT2) influences the cisplatin-induced nephrotoxicity in cancer patients. 米国腎臓学会第 44 年会 (平成 23 年 11 月 9-13 日、フィラデルフィア).
- ③ Komori M, et al., Renoprotective effect of sulfotransferase (SULT) inhibitors on ischemia/reperfusion (IR)-induced acute kidney injury (AKI) rats. 米国腎臓学会第 44 年会 (平成 23 年 11 月 9-13 日、フィラデルフィア).
- ④ 岩田一史ら、有機カチオントランスポーター OCT2 の遺伝子多型とシスプラチン腎障害との関連. 第 49 回日本癌治療学会学術集会 (平成 23 年 10 月 27 日、名古屋).
- ⑤ 齋藤秀之、腎機能低下に伴う経口分子標的治療薬の動態変動と影響因子. 医療薬学フォーラム 2011 旭川/クリニカルフ

ァーマシーシンポジウム (平成 23 年 7 月 9-10 日、旭川).

- ⑥ 小森 めぐみら、虚血再灌流急性腎障害ラットにおける SULT 阻害薬の尿毒症物質蓄積抑制効果と腎保護作用. 第 54 回日本腎臓学会学術総会 (平成 23 年 6 月 15-17 日、横浜).
- ⑦ Saito H. et al., Alleviation of cisplatin-evoked acute kidney injury using phytochemical polyphenols is accompanied by reduced accumulation of indoxyl sulfate in rats. 第 7 回国際尿毒症学会 (平成 23 年 5 月 12-14 日、名古屋).

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤秀之、他、乾 賢一編、洋土社、薬物トランスポーター活用ライブラリー: 機能・輸送基質から創薬・臨床応用まで、2009、pp87-92.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

- ①名称: インドキシル硫酸の産生の阻害剤のスクリーニング方法、インドキシル硫酸代謝産生阻害剤、及び腎障害軽減剤  
発明者: 齋藤秀之、濱田哲暢  
権利者: 国立大学法人熊本大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-234185  
出願年月日: 平成 22 年 10 月 19 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/pharmacy/division/default.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 秀之 (SAITO HIDEYUKI)  
熊本大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 40225727

### (2) 研究分担者

濱田 哲暢 (HAMADA AKINOBU)  
熊本大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 00322313

### (3) 連携研究者

野々口 博史 (NONOGUCHI HIROSHI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30218341

増田 智先 (MASUDA SATOHIRO)  
京都大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90303825