

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590252

研究課題名 (和文) 抗菌薬による腎障害発現機序の解明

研究課題名 (英文) The elucidation of the mechanisms underlying antimicrobial agents-induced nephrotoxicity

研究代表者

大石 了三 (OISHI RYOZO)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90112325

研究成果の概要：

ポリエン系抗真菌薬のアムホテリシン B は、腎細胞膜のコレステロールに結合してポアを形成し、細胞内への Na<sup>+</sup>流入ならびに、小胞体およびミトコンドリア由来の Ca<sup>2+</sup>上昇を引き起こすことで、腎細胞にネクローシスを引き起こすことが明らかとなった。加えて、アムホテリシン B による腎細胞内の Ca<sup>2+</sup>上昇およびミトコンドリア機能障害には、MAP キナーゼの活性化が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：抗菌薬、アムホテリシン B、腎障害、ネクローシス、ミトコンドリア、

カルシウム、MAP キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌薬は、肺炎や気管支炎、敗血症といった様々な感染症の治療に使用され、免疫力の低下した患者の治療や、外科手術など易感染状態を惹起する医療処置下においては、必要不可欠な薬剤である。その一方で、抗菌薬は薬剤性腎障害を引き起こす最も主要な原因薬剤であり、その頻度は、薬剤性腎障害全体の約 36%をも占める。しかしながら、抗菌薬による腎障害の詳細な発現機序は明らかになっておらず、有効な保護薬や治療薬も皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究は、培養腎細胞ならびに、ラットやマウスを用いて抗菌薬誘発腎障害評価モデルの作製を行い、抗菌薬による腎障害発現機序の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 24 ウェルプレートに播種した培養腎尿管細胞 (LLC-PK1 細胞) に、抗真菌薬アムホテリシン B を曝露し、用量および時間依存的な細胞生存率の変化を、WST-8 法ならびに乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の漏出率により評

価した。吸光度の測定には 96 ウェルマイクロプレートリーダーを使用した。

(2) 細胞死の形態学的特徴の評価は、8 チャンバープレートに播種した LLC-PK1 細胞を使用し、アムホテリシン B を曝露した後に TUNEL 染色法および propidium iodide (PI) 染色法を使用し、蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 細胞内 ATP 量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

(4) 細胞膜コレステロールの枯渇は、メチル化- $\beta$ -シクロデキストリンを使用した。

(5) ①低  $\text{Na}^+$  buffer は  $\text{NaCl}$  を 70 mM に調製した Krebs-ringer buffer (mM):  $\text{NaCl}$  (118),  $\text{KCl}$  (4.7),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.2),  $\text{CaCl}_2$  (2.5),  $\text{NaHCO}_3$  (25), d-glucose (11.5), pH 7.4) を用いた。 $\text{Ca}^{2+}$  free buffer は 1 mM のグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) を添加し調製した。

②小胞体およびミトコンドリアの関与は、リアノジン受容体阻害剤 dantrolene、ミトコンドリア  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系阻害剤 CGP37157、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  単輸送体阻害剤 ruthenium red、 $\text{IP}_3$  受容体阻害剤 xestospongine C を用いて検討した。

(6) ①MAP キナーゼの関与は、p38MAPK 阻害剤 PD169316、JNK 阻害剤 JNK inhibitor II、ERK 阻害剤 PD98059 を用いて検討した。

②MAP キナーゼの発現変化は、それぞれに特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロット法により評価した。

(7) ミトコンドリア機能の評価にはミトコンドリア膜感受性試薬 JC-1 を使用し、蛍光顕微鏡にて観察した。

(8) 【統計解析】データは、平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には Student's t-test を、多重の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) による解析後、Dunnett's test により有意差検定を行ない、有意水準は 5% とした。

#### 4. 研究成果

(1) LLC-PK1 細胞にアムホテリシン B を処置することにより、用量および時間依存的な細胞障害が観察された (図 1)。

(2) アムホテリシン B 処置 (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 24 時間) により、PI 染色に陽性な細胞が顕著に増加した。一方で、TUNEL 染色陽性細胞は、認められなかった (図 2)。

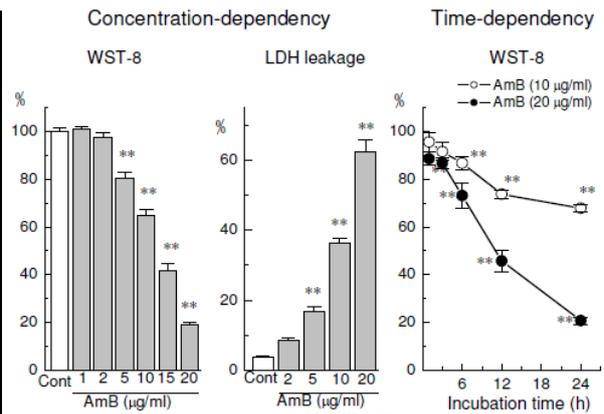


図 1 アムホテリシン B 処置による濃度および時間依存的な腎細胞障害

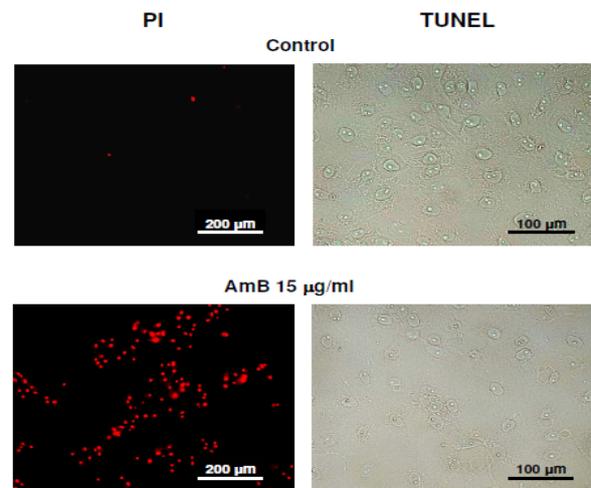


図 2 アムホテリシン B 処置 (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 24 時間) による PI 陽性細胞の顕著な増加

(3) アムホテリシン B を処置することにより、濃度および時間依存的に細胞内 ATP 含量が低下した (図 3)。

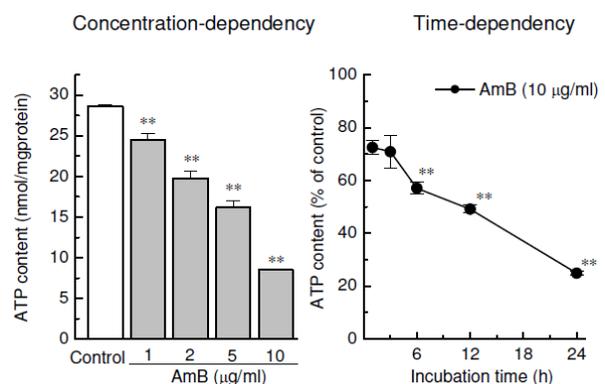


図 3 アムホテリシン B 処置による濃度および時間依存的な細胞内 ATP 含量の低下

(4) アムホテリシン B による腎細胞障害は、メチル化- $\beta$ -シクロデキストリン処置により顕著に抑制され、その効果はコレステロールの併用により消去された (図 4)。

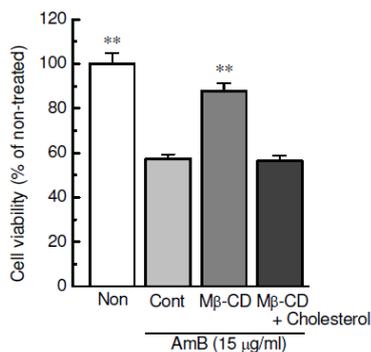


図4 アムホテリシンBによる腎細胞障害発現における細胞膜コレステロールの関与

(5)①アムホテリシンBによる腎細胞障害は、低  $\text{Na}^+$  buffer の条件下および、細胞内カルシウムキレート剤 BAPTA-AM の共存下において顕著に抑制された。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  free buffer は、アムホテリシンBによる細胞障害に影響を示さなかった(図 5a)。

②リアノジン受容体阻害剤 dantrolene (30  $\mu\text{M}$ ) は、アムホテリシンBによる腎細胞障害を有意に抑制したが、IP3 受容体阻害剤 xestospongine C (1  $\mu\text{M}$ ) は保護効果を示さなかった。一方、ミトコンドリア  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系阻害剤 CGP37157 (10  $\mu\text{M}$ )、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  単輸送体阻害剤 ruthenium red (10  $\mu\text{M}$ ) は、アムホテリシンBによる腎細胞障害を顕著に抑制した(図 5b)。

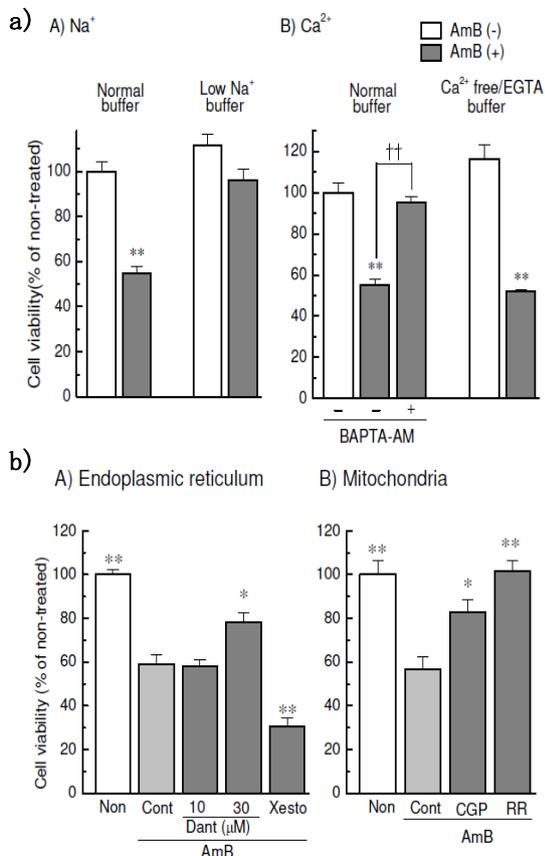


図5 アムホテリシンBによる腎細胞障害発現におけるナトリウムおよびカルシウムの関与

(6)①アムホテリシンBによる腎細胞障害は、p38 阻害剤 PD169316 (10  $\mu\text{M}$ )、JNK 阻害剤 JNK inhibitor II (10  $\mu\text{M}$ )、ERK 阻害剤 PD98059 (10  $\mu\text{M}$ ) により顕著に抑制された(図 6a)。

②アムホテリシンB (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の処置により、p38、JNK、ERK のリン酸化体が顕著に増加した(図 6b)。

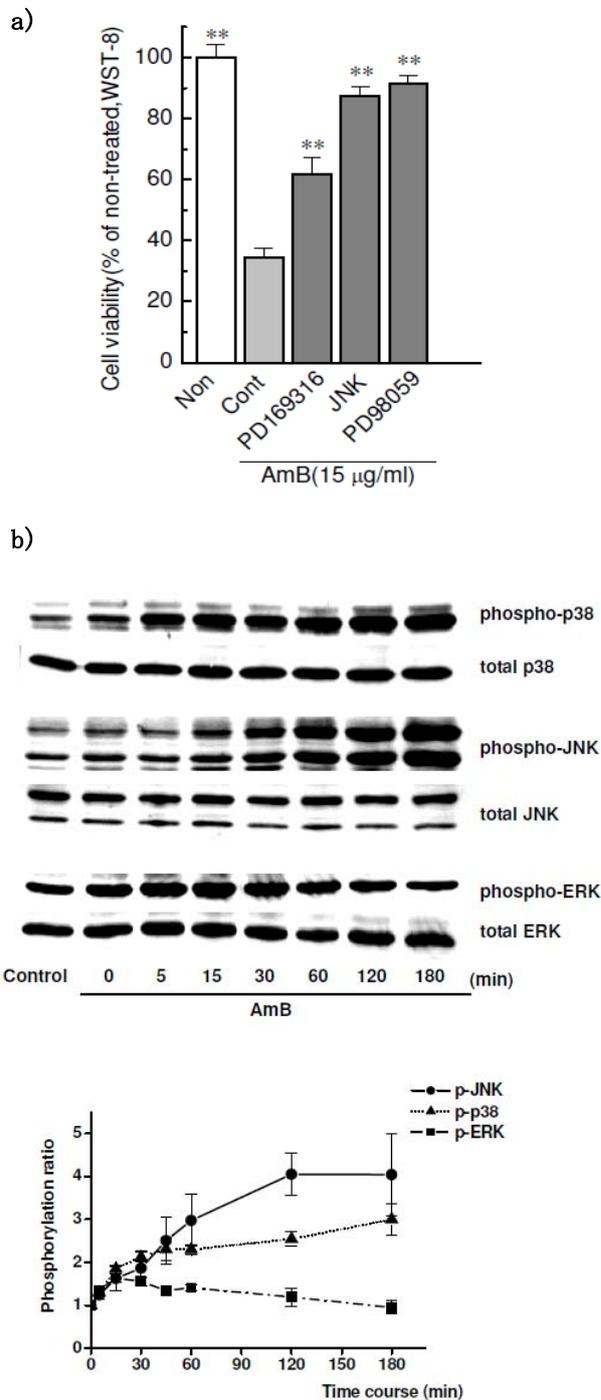


図6 アムホテリシンBによる腎細胞障害に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果(A)およびアムホテリシンBによる腎細胞内 MAP キナーゼ発現変化(B)

(7) アムホテリシン B (15  $\mu$ g/mL, 3 時間) 処置により、JC-1 による緑色蛍光染色細胞の増加が認められ、ミトコンドリア膜電位が低下することが明らかとなった。その障害は、CGP37157 (10  $\mu$ M)、ruthenium red (10  $\mu$ M)、JNK inhibitor II (10  $\mu$ M)、PD98059 (10  $\mu$ M) の処置により保護された。一方、JNK inhibitor II ネガティブコントロール (10  $\mu$ M) は効果を示さなかった (図 7)。

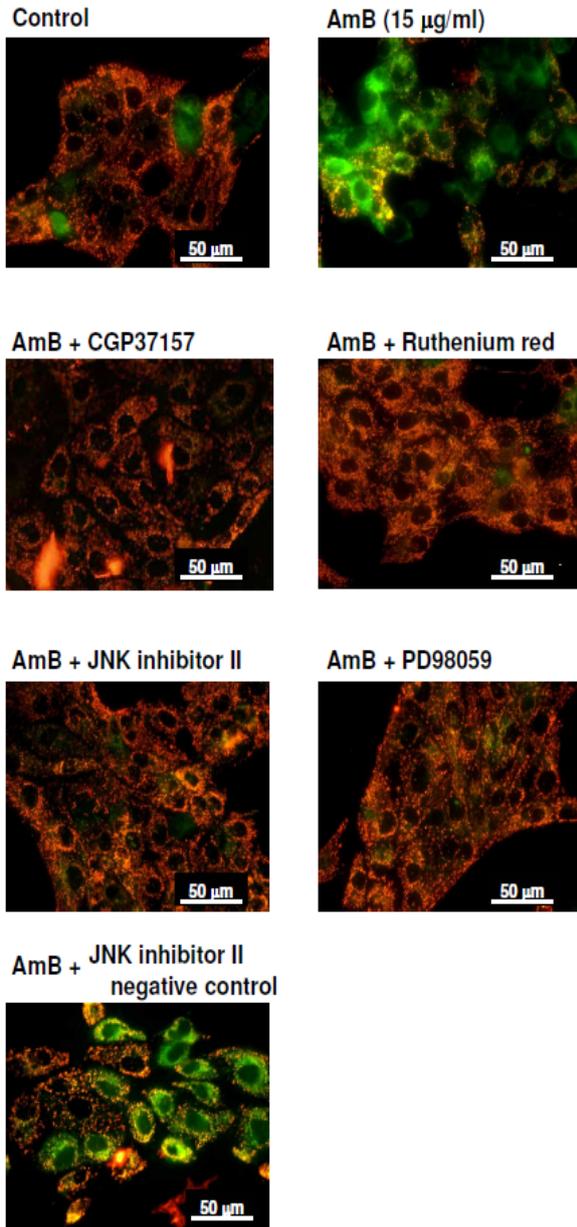


図7 アムホテリシンBによるミトコンドリア膜電位の変化

## 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 1 件)

- ① Yano T, Itoh Y, Kawamura E, Maeda A, Egashira N, Nishida M, Kurose H, Oishi R. Amphotericin B-Induced Renal Tubular Cell Injury is Mediated by Na<sup>+</sup> Influx through Ion-Permeable Pores and Subsequent Activation of MAP Kinases and Elevation of Intracellular Ca<sup>2+</sup>. Antimicrob Agents Chemother. 53:1420-1426:2009, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 前田朱香, 矢野貴久, 河村瑛子, 西田基宏, 江頭伸昭, 伊藤善規, 黒瀬等, 大石了三. アムホテリシンBによる腎尿管細胞障害におけるMAPK 活性化ならびにミトコンドリア脱分極の関与. 第 61 回 日本薬理学会 西南部会, 2008 年 11 月 28 日, 鳥取

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大石 了三 (OISHI RYOZO)  
九州大学・大学病院・教授  
研究者番号: 90112325

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

江頭 伸昭 (EGASHIRA NOBUAKI)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 80352269

伊藤 善規 (ITOH YOSHINORI)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50159927