

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告

平成 24 年 4 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790153

研究課題名（和文）シスプラチン毒性代謝物の尿細管輸送特性に基づく腎障害予防法の基盤構築

研究課題名（英文）Basic research for the prevention of cisplatin-induced renal toxicity based on the characteristics of renal tubular transport of its cytotoxic metabolite

研究代表者

岩本 卓也（IWAMOTO TAKUYA）

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30447867

研究成果の概要（和文）：本研究は、CDDP-NAC（N-アセチルシステイン複合体）の尿細管輸送に関わる薬物トランスポータの役割を解明することを目的として実施した。OCT2, OAT1, OAT3 を発現させた HEK 細胞では、CDDP-NAC の細胞内取り込み速度は CDDP 単独に比べ低下していたことから、NAC 投与は CDDP の尿細管への取り込みを低下させることで、腎毒性を軽減する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to investigate the characteristics of renal tubular transport of N-acetylcysteine conjugate of cisplatin (CDDP-NAC, cytotoxic metabolite). In the human embryonic kidney 293 (HEK293) cells transfected OCT2, OAT1 or OAT3, the CDDP-NAC accumulation in these cells was significantly lower than that of CDDP alone. NAC treatment prevented CDDP uptake in renal tubular cells, which might contribute to the reduced toxicity of CDDP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：シスプラチン、腎障害、薬物トランスポータ、システイン複合体

1. 研究開始当初の背景

抗悪性腫瘍薬シスプラチン（CDDP）の用量規制因子の一つは腎障害である。生体内に投与された CDDP の一部は肝臓でグルタチオン複合体（CDDP-GSH）に変換され、次いで細胞表面酵素によってシステイン複合体（CDDP-Cys）へと変換される。CDDP-Cys は細胞内に取り込まれ、毒性本体と考えられるチオール化合物（CDDP-S⁻）へと変換される。この経路に関わる変換酵素を阻害することで、腎障害が軽減されることが報告され

ている。したがって、CDDP による腎障害には、CDDP-Cys の尿細管輸送特性が深く関わることが予想される。また、ウサギの近位尿細管において CDDP と N-acetyl Cysteine (NAC) 複合体（CDDP-NAC）の輸送が、典型的な有機アニオントランスポーター（OATs）の基質であるパラアミノ馬尿酸（PAH）により阻害されることが報告されている（Colb RJ et al., *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 132-138, 2003）。

2. 研究の目的

これまでの報告から、シスプラチンの毒性本体の前駆体と考えられる CDDP-Cys の尿細管輸送には、OATs の関与が示唆されている。また、現在臨床試験が行われている抗がん剤補助薬 BNP-7787 の腎障害軽減メカニズムとして、上記グルタチオン複合体の変換経路への作用が研究されており (Hausheer FH et al., *Cancer Chemother Pharmacol* 67: 381-391, 2011)、CDDP-Cys の輸送メカニズムを明らかにすることは重要である。したがって本研究は CDDP-Cys の尿細管輸送に関わる薬物トランスポータの役割を解明し、研究成果を腎障害予防法の構築に還元することを目的とした。

3. 研究の方法

① CDDP および CDDP-NAC による細胞傷害性の評価

LDH assay: CDDP または CDDP-NAC, CDDP-Cys 等量混合物を各種細胞に一定時間 (30 分) 曝露し、fresh culture medium に置き換えて 24 時間インキュベーションした。その後、細胞を回収し、培養液中の LDH、細胞内の LDH を測定した。LDH release (%) を算出することで細胞傷害性を評価した。

② 細胞内への薬物取り込み実験

(1) 各種トランスポータをトランスフェクトした HEK 細胞 (HEK-hOAT1, HEK-hOAT3, HEK-hOCT2) の基質薬物輸送機能の確認。hOAT1 の基質薬物として [¹⁴C]パラアミノ馬尿酸 (PAH)、hOAT3 の基質薬物として [³H]Estrone 3-sulfate (ES)、hOCT2 の基質薬物として [¹⁴C]Metformin を用いた。

(2) 各種トランスポータの発現・輸送能をその特異的基質で確認したのち、CDDP または CDDP-NAC 等量混合物を 30 分間曝露させ、細胞内 Pt 取り込み量を原子吸光分光光度計にて測定した。

(3) CDDP 溶液にシステインを一定量、一定時間加え、CDDP の吸光度を経時観察した。吸光度変化から、CDDP へのシステインの一分子付加体と二分子付加体の生成について、条件を検討した。

4. 研究成果

① CDDP および CDDP-NAC による細胞傷害性の評価

(1) 有機カチオントランスポータ (OCT2) を発現する LLC-PK1 細胞に CDDP 単剤を曝露させたとき、濃度依存的に LDH release の上昇がみられた (Fig. 1)。また、LLC-PK1 細胞に 500 μ M CDDP 単剤、500 μ M CDDP-NAC(1:1)、500 μ M CDDP-Cys(1:1) をそれぞれ曝露させたとき、すべてにおいてコントロール群に比べて LDH release が上昇したが、CDDP 単剤曝露は、CDDP-NAC、CDDP-Cys に比べ有意に LDH release の上昇していた (Fig. 2)。CDDP は OCT2 により輸送されることが知られていることから、CDDP 単剤、CDDP-NAC、CDDP-Cys の細胞毒性の違いは、OCT2 による輸送の差に起因している可能性が示唆された。

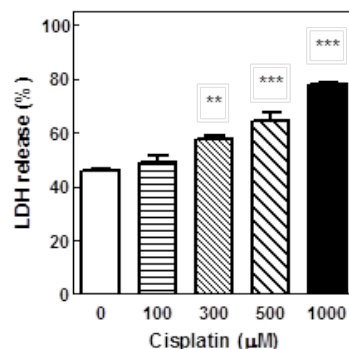


Fig. 1 Effects of cisplatin on the LDH release from LLC-PK1 cell monolayers. Each column represents the mean \pm SEM of three. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant difference from control by Dunnett's Multiple Comparison test.

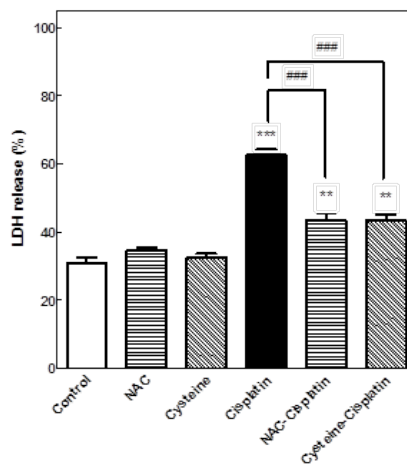


Fig. 2 Effects of cisplatin and cisplatin-conjugate on the LDH release from LLC-PK1 cell monolayers. Each column represents the mean \pm SEM of three. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant difference from control, ### $p < 0.001$, significant difference from cisplatin by Tukey's Multiple Comparison test.

(2) 有機アニオントランスポータ(OAT)を発現する OK 細胞に CDDP 単剤、CDDP-NAC、CDDP-Cys をそれぞれ曝露させたとき、CDDP 単剤投与が最も LDL 遊離量が多かった。このことから、OAT による基質認識性は CDDP>CDDP-NAC、CDDP-Cys である可能性、または β -lyase が細胞内に少なく、CDDP-NAC、CDDP-Cys が CDDP-S'に変換されない可能性が示唆された。

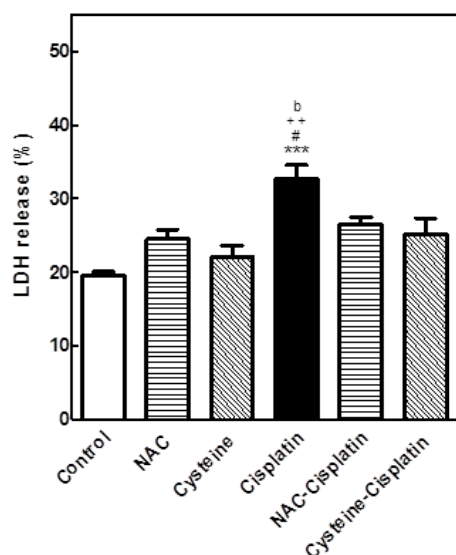


Fig.3 Effects of cisplatin and cisplatin-conjugate on the LDH release from OK cell monolayers. Cisplatin was diluted in HBSS with 5 mM HEPES, pH 7.2. Each column represents the mean \pm SEM of three. *** p <0.001, significant difference from control; # p <0.05, from NAC; ++ p <0.01, from Cysteine; ^b p <0.05, from Cysteine-Cisplatin by Tukey's multiple comparison test.

② CDDP, CDDP-NAC の細胞内輸送特性の検討

(1) 各種トランスポータをトランスフェクトした HEK 細胞 (HEK-hOAT1, HEK-hOAT3, HEK-hOCT2)の発現・輸送能をトランスポータ特異的基質で確認したところ、3種ともコントロール群に比べ有意に基質の取り込みがみられた (Fig. 4)。この結果から、それぞれの細胞はトランスポータによる輸送特性を評価できる細胞であることが確認された。

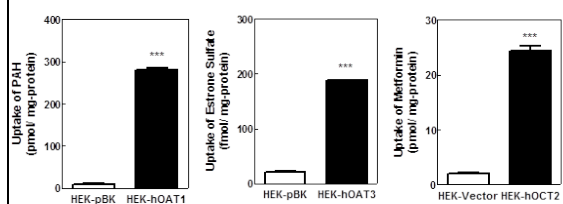


Fig. 4 Uptake of various compounds by HEK-hOAT1, HEK-hOAT3 and HEK-hOCT2. HEK-pBK, HEK-hOAT1, HEK-hOAT3, HEK-Vector and HEK-hOCT2 were incubated 5 μ M PAH(A), 20 nM ES(B), 5 μ M Metformin (C) for 15 min at 37°C. After the incubation, the radio activity of solubilized cells was measured. Each column represents the mean \pm SEM of three HEK cells. *** p <0.001, significant difference from HEK-pBK or Vector.

(2) HEK-hOCT2に CDDP 単剤を曝露させたところ、コントロール (vector) に比べて有意な細胞内 Pt 蓄積量の上昇がみられた (Fig. 5) ことから、CDDP は hOCT2 の基質であり、LLC-PK1 細胞でみられた細胞毒性は、OCT2 による輸送と関連していることが示唆された。

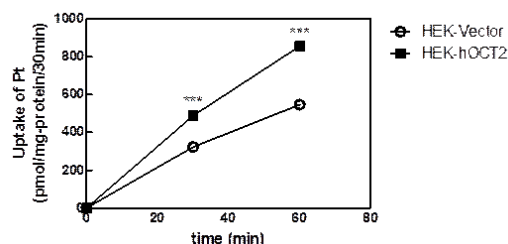


Fig. 5 Uptake study of CDDP by HEK-hOCT2 . HEK-Vector and HEK-hOCT2 were incubated with 500 μ M CDDP for 30 min at 37°C . After the incubation, Pt was measured by atomic absorption. Each column represents the mean \pm SEM of three. *** p <0.001, significant difference from HEK-Vector.

(3) NAC の 1 分子結合体および 2 分子結合体の生体膜輸送の特性について検討した。CDDP に等量の NAC, 2 倍量, 3 倍量, 4 倍量の NAC を加えたところ、NAC の容量依存的に吸光度の上昇がみられ、反応時間が 3 および 5 時間では、各溶液の吸光度の差が大きかったことから、反応時間は 4 時間で CDDP-NAC の細胞輸送実験を行った (Fig.6)。

OAT3, OCT2 を発現させた HEK 細胞では、CDDP 単剤投与の細胞内取り込み速度が最も速く、NAC の反応割合を高くするにつれて、細胞内への取り込み速度が低下していた。また、OAT1 を発現させた HEK 細胞においても、CDDP 単剤投与した場合に細胞内取込

み速度が最も速く、次いで等量、2 倍量、4 倍量、3 倍量の NAC で反応させた複合体の順であった(Fig.7)。

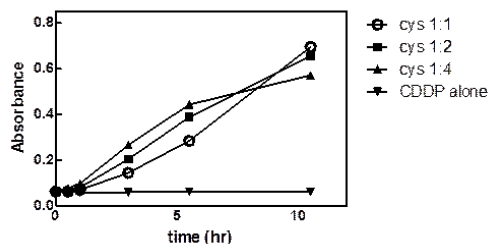


Fig. 6 Time course of the change in absorbance. CDDP (250 μ M) and CDDP (250 μ M)-Cysteine conjugates (1:1, 1:2 and 1:4) were measured at 309nm.

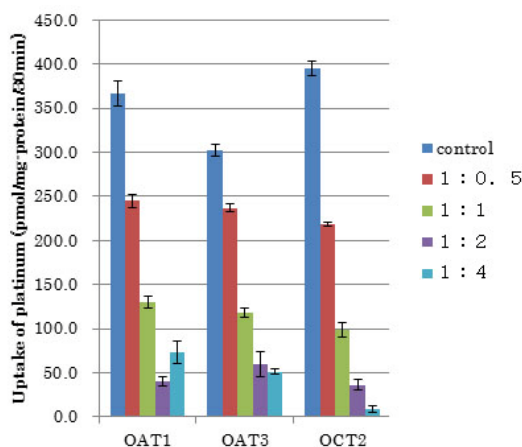


Fig. 7 Uptake study of CDDP and CDDP-Cysteine by HEK cells. HEK cells were incubated with 250 μ M CDDP (control) or 250 μ M CDDP preincubated with equimolar cysteine (Cys)(1:1), 2-fold Cys (1:2), 3-fold Cys (1:3) and 4-fold Cys (1:4) for 4hr at 37°C. After 30 min incubation, Pt was measured by atomic absorption. Each column represents the mean \pm SEM of three.

これまでに、CDDP の毒性本体はシステイン複合体から生成される CDDP-S⁻という報告、システインの投与は腎毒性を軽減するといった相反する報告がある。本研究結果から、システインの投与により生成される CDDP-NAC 複合体は、CDDP よりも OCT2、OAT1、OAT3 に対する認識性が弱く、腎側底膜からの輸送が低下するため、腎細胞への傷害が軽減されることが示唆された。

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 4 件)

- ① Ueno Y, Matsuda H, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. Involvement of Specific Transport System on Uptake of Lactone Form of SN-38 in Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 2012, 35:54-58.
- ② Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, Iwamoto T, Uemoto S, Nobori T, Okuda M. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant*, 査読有, 2011, 16: 55-62.
- ③ Iwamoto T, Monma F, Fujieda A, Nakatani K, Katayama N, Okuda M. Hepatic Drug Interaction Between Tacrolimus and Lansoprazole in a Bone Marrow Transplant Patient Receiving Voriconazole and Harboring CYP2C19 and CYP3A5 Heterozygous Mutations. *Clin Ther*, 査読有, 2011, 33: 1077-1080.
- ④ 岩本卓也, がん薬物治療に伴う有害反応の発現機構と要因分析に関する研究, *医療薬学*, 査読有, 2011, 37: 269-276.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 倉田朋彦, 岩本卓也, 河原佑樹, 奥田真弘, ペメトレキシドの尿細管分泌機構におけるヒト有機アニオントランスポーター 3 (hOAT3, SLC22A7) の役割 日本薬学会第 132 年会 2012.3.29 (札幌)
- ② 福森史郎, 藤井英太郎, 伊藤正明, 村木優一, 岩本卓也, 奥田真弘, 心房細動に対するカテーテルアブレーション施行患者の肝酵素上昇とヘパリン持続静注との関連性 第 76 回日本循環器学会学術集会 2012.3.16 (福岡)
- ③ Ikemura K, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. Decreased oral absorption of cyclosporine A through elevated intestinal CYP3A and P-glycoprotein by oxidative stress after liver ischemia-reperfusion. 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2011.11.26 (名古屋)
- ④ 斎藤佳菜子, 小田裕靖, 水野聡朗, 山下芳

樹, 田丸智巳, 景山裕紀, 石川英二, 河原佑樹, 岩本卓也, 片山直之, 腹膜透析患者に放射線化学療法を実施した進行食道癌の一例, 第 49 回日本癌治療学会学術集会 2011.10.28 (名古屋)

- ⑤ Kurata T, Muraki Y, Iwamoto T, Okuda M. Pathophysiological Role of Chenodeoxycholic Acid on Hepatic Disposition of Metformin via Organic Cation Transporter 1 in Acute Cholestasis. American Association of Pharmaceutical Scientists 2011 2011.10.23 (Washington DC)
- ⑥ 榎屋友幸, 村木優一, 岩本卓也, 長谷川正裕, 須藤啓広, 奥田真弘: 人工股関節置換術後にフォンダパリヌクスを使用した患者におけるヘモグロビン低下に及ぼす危険因子の探索, 第 21 回日本医療薬学会年会 2011.10.2 (神戸)
- ⑦ 岩本卓也, 湯田厚司, 田畑務, 杉本浩子, Esteban C Gabazza, 平井博之, 小嶋滋之, 奥田真弘: 好塩基球の膜蛋白 CD203c の発現量を指標としたカルボプラチン過敏症の予測性評価, 第 21 回日本医療薬学会年会 2011.10.1 (神戸)
- ⑧ 小出哲朗, 岩本卓也, 田中克浩, 黒木香行, 村松正俊, 奥田真弘, 渡邊啓子: アマンタジンとフルボキサミンの併用によりセロトニン症候群が重篤化したと考えられた症例, 第 21 回日本医療薬学会年会 2011.10.1 (神戸)
- ⑨ 福森史郎, 藤井英太郎, 村木優一, 岩本卓也, 奥田真弘: 心房細動に対するカテテルアブレーション施行患者の肝酵素上昇とヘパリン持続静注との関連性, 医療薬学フォーラム 2011 2011. 7. 9 (旭川)
- ⑩ 宮崎仁子, 岩本卓也, 田口修, 神谷圭司, 村木優一, 奥田真弘: ペメトレキセドナトリウム水和物投与患者における血小板減少の危険因子に関する検討, 医療薬学フォーラム 2011 2011. 7. 9 (旭川)
- ⑪ 池村健治, 井之上浩一, 水谷秀樹, 岡尚男, 岩本卓也, 奥田真弘, 肝虚血再灌流障害時の Cyclosporine A の経口 bioavailability 低下における酸化ストレスを介した小腸 CYP3A 及び P-糖蛋白質の発現変動機構, 日本薬剤学会第 26 年会 2011.5.29 (東京)
- ⑫ Kurata T, Muraki Y, Iwamoto T, and Okuda M. Pathophysiological Role of Chenodeoxycholic Acid on Hepatic Disposition of Metformin via Organic Cation Transporter 1 in Acute Cholestasis. 日本薬剤学会第 26 年会 2011.5.29 (東京)

〔図書〕 (計 1 件)

岩本卓也, 他, 病氣と薬パーフェクト BOOK2012 「成人 T 細胞白血病・リンパ腫」 pp.1496-1497、「多発性骨髄腫」 pp. 1504-1506、「骨肉腫」 pp. 1510-1511、南山堂、2012 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 卓也 (IWAMOTO TAKUYA)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 30447867

(2) 研究協力者

奥田 真弘 (OKUDA MASAHIRO)
三重大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 70252426