

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 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790805

研究課題名（和文）ラット慢性腎不全モデルにおけるチロシンキナーゼ阻害薬の腎不全抑制効果

研究課題名（英文）The therapeutic effect of tyrosine kinase inhibitor in 5/6 nephrectomized rats

研究代表者

伊與田 雅之 (IYODA MASAYUKI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20384365

研究成果の概要（和文）：我々はクリオグロブリン関連膜性増殖性糸球体腎炎や抗 GBM 抗体腎炎におけるイマチニブ(selective tyrosine-kinase inhibitor)の治療効果を報告してきた。今回、イマチニブと比較して Bcr-Abl に約 30 倍、c-Kit、PDGFR に同等の阻害活性を持つニロチニブの慢性腎不全進行抑制効果に関して検討した。59 匹の 5/6 腎摘ラットを治療群と未治療群に無作為に振り分けた。対照群として 12 匹の sham ope 群を作成した。ニロチニブは 45mg/kg、コントロール群は同量の蒸留水を術後 2 週後から連日 8 週間経口投与した。また腎線維芽細胞、メサンギウム細胞を用いてニロチニブによる線維化抑制のメカニズムを検討した。ニロチニブ投与群において有意に 1)治療開始 1 週間からの蛋白尿の低下 2)腎重量の低下 3)血清 Cr 値の低下 4)糸球体硬化、尿細管障害の軽減 5)腎皮質における線維化マーカー mRNA 発現低下 (collagen I, TGF- β , fibronectin, PAI-1) 6) 間質における ED1+細胞(マクロファージ)の減少 7)生存率の改善を認めた。腎線維芽細胞、メサンギウム細胞を用いた培養実験では、ニロチニブ前処置により、PDGF-BB による PDGFR β リン酸化抑制がみられた。ニロチニブは血圧非依存性に腎不全進行を抑制した。各種腎炎モデルで強力な腎炎抑制効果を示し、主に癌領域で広く臨床で使用されているイマチニブやニロチニブは、新規の腎炎・腎不全治療薬と成り得る強い可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Nilotinib is a second-generation tyrosine kinase inhibitor that demonstrates a 30-fold increase in activity against Bcr-Abl, and a similar level of activity against the PDGF receptor (PDGFR) and c-Kit when compared to imatinib, a compound that has been previously shown to exhibit therapeutic benefits in animal models of renal disease, including cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis and nephrotoxic serum nephritis. In the current study, we investigated the role of nilotinib in the progression of established renal failure. Adult male Sprague Dawley rats were subjected to 5/6 nephrectomy or laparotomy (sham-operated). Rats with 5/6 nephrectomy were then administered either nilotinib (45mg/kg) or vehicle via daily oral gavage from 2 weeks after surgery, and for a period of 8 weeks. Blood pressure (BP), proteinuria (U-P), serum creatinine (Cr) and body weight (BW) were measured periodically. Renal morphological investigations were performed at sacrifice. In vitro, we used renal fibroblasts (NRK49F) and primary mesangial cells. Cells were pretreated with nilotinib or medium alone, and collagen type I synthesis and PDGFR β

phosphorylation induced by angiotensin II or PDGF-BB were analyzed by real-time RT-PCR and immunoblotting. BP and BW were comparable between the two treatment groups throughout the study. Following 6 and 8 weeks of treatment, serum Cr levels in the nilotinib-treated rats were significantly lower than that of the vehicle-treated rats. When compared to vehicle treatment, nilotinib-treated rats demonstrated reduced U-P at 1 week after treatment. This reduction was maintained over the course of the study. Nilotinib treatment also resulted in a decrease in remnant kidney hypertrophy, in addition to reduced scores of glomerulosclerosis and tubulointerstitial damage. Renal cortical mRNA for collagen type I, TGF- β , fibronectin, and PAI-1 were also significantly decreased in the nilotinib treated group. In vitro, nilotinib blocked collagen type I/GAPDH mRNA production induced by angiotensin-II in renal fibroblasts and mesangial cells. Nilotinib also decreased collagen type I/GAPDH mRNA levels and prevented PDGFR β phosphorylation induced by PDGF-BB in mesangial cells. Nilotinib treatment significantly attenuates renal fibrosis in vivo and in vitro. Our results suggest that nilotinib may prove useful in limiting the progression of chronic renal disease to end-stage renal failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
H23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：チロシンキナーゼ阻害薬、慢性腎臓病、腎線維化

1. 研究開始当初の背景

今回イマチニブと比較して約30倍のBcr-Abl阻害活性をもつ第2世代のチロシンキナーゼ阻害薬ニロチニブ(nilotinib, タシグナ®)の慢性腎不全抑制薬としての有効性について5/6腎摘ラット腎不全モデルを用いて検討することを目的とする。

イマチニブ(imatinib mesylate, グリベック®)はAbl family (c-Abl、Bcr-Abl、v-Abl)、c-Kit (stem cell factor 受容体)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR: 血小板由来増殖因子受容体)などの

チロシンキナーゼに対する阻害活性を有する癌分子標的治療薬であり、我が国では慢性骨髄性白血病(CML)、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(ALL)、消化管間質腫瘍(GIST)に対して承認されている。

腎炎領域におけるイマチニブの治療実験は、2001年にGilbertらがラットThy1腎炎を用いて行ったのが初めである(Gilbert RE, et al. *Kidney Int* 2001, 59, 1324-32)。その後、糖尿病性腎症モデルマウス(Lassila M, et al. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16, 363-73)、ループス腎炎モデルマウス(Zoja C, et al. *Kidney Int* 2006, 70, 97-103; Sadanaga A, et

al. Arthritis Rheum 2005, 52, 3987-96) など次々とイマチニブの治療効果が報告され、そのメカニズムの中心は PDGFR 阻害によるメサンギウム細胞増殖抑制にあるとされている。しかしながら、ループス腎炎モデルマウスの MRL-lpr/lpr マウスではリンパ節腫大の抑制や血清 IgG 値、抗 ds-DNA 抗体価低下、NZB×NZW F1 マウスでは免疫複合体沈着抑制、抗 ds-DNA 抗体価低下など PDGFR 抑制のみでは説明のつかない所見も得られ、現在では T 細胞、B 細胞、マクロファージなどへの影響も腎疾患改善の一翼を担っていると考えられている。実際に、CML 治療濃度相当のイマチニブは *in vitro* にて TCR 直下のシグナル分子を抑制し、T 細胞の増殖、活性化を抑制する (Seggewiss R, et al. Blood 2005, 105, 2473-9)。また、*in vivo* にて遅延型過敏反応を抑制する (Dietz AB, et al. Blood 2004, 104, 1094-9) ことが報告されている。イマチニブは B 細胞増殖や抗体産生も抑制する。腎炎領域では、筆者らが Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) トランスジェニックマウスにおけるクリオグロブリン関連膜性増殖性糸球体腎炎において、イマチニブが B 細胞の分化・成長を抑制し、それがクリオグロブリンの産生低下に繋がることを報告している (Iyoda M, et al. J Am Soc Nephrol 2009, 20, 68-77)。この機序に関しては、c-Abl 欠損マウスや c-Kit 欠損マウスでは骨髄内における B 細胞の成長抑制がみられるため、それらの抑制によるものであると考察している。さらに、マクロファージ抑制に関して筆者らは、Wistar-Kyoto (WKY) ラット抗 GBM 抗体腎炎において、イマチニブが macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 受容体である c-fms を抑制することを示し、これにより糸球体内マクロファージ浸潤が抑制された可能性を報告している

(Iyoda M, et al. Kiney Int 2009, 75, 1060-70)。これはイマチニブが c-fms を抑制することにより単球/マクロファージの成長・機能を阻害するという *in vitro* の報告と合致する所見である (Dewar AL, et al. Blood 2005, 105, 3127-32)。その他、イマチニブの樹状細胞 (Borg C, et al. J Clin Invest 2004, 114, 379-88) や肥満細胞 (Paniagua RT, et al. J Clin Invest 2006, 116, 2633-42) などへの影響も報告されている。このようにイマチニブは、PDGFR 以外にも作用し pleiotropic に腎炎を抑制していると考えられる。

2. 研究の目的

実験の概要としては、5/6 腎摘ラットと sham operated ラットを、それぞれ治療群と未治療群に無作為に振り分け、ニロチニブ、コントロール群は同量の蒸留水をそれぞれ経口投与し、腎不全進行抑制効果を検討する。治療期間中、蛋白尿、体重、血圧を経時的に測定する。腎組織においては糸球体硬化、尿細管障害の重症度評価を行い、免疫組織染色として ED-1 (マクロファージ)、CD3 (T 細胞)、PCNA (proliferating cell)、腎皮質における各種線維化マーカー (collagen type I、TGF- β 、fibronectin、PAI-1) を real-time RT-PCR にて解析し、ニロチニブの 5/6 腎摘ラットにおける治療効果とそのメカニズムを解明する。また、両群間の生存率についても検討する。さらに詳細なメカニズムを検討するため、培養メサンギウム細胞、近位尿細管細胞、腎線維芽細胞を用いて、PDGF-BB またはアンギオテンシン II 刺激に対するニロチニブの線維化抑制効果や、PDGFRb、c-Abl、Smad2/3 の活性化をどのようにニロチニブが抑制するかを検討する。

3. 研究の方法

本研究はラット慢性腎不全モデル (5/6 腎摘ラット)におけるニロチニブの治療効果を観察する。薬剤治療群と無治療群に分け、その治療効果を比較検討し、培養実験も行いその機序を解明する。

主に 5/6 腎摘ラットにおけるニロチニブの治療効果について検討する。

I. 動物種：ラット 系統：Sprague-Dawley (SD)

40 匹の 5/6 腎摘ラットと 20 匹の sham operated コントロールラットを購入し、それぞれ治療群と未治療群に無作為に振り分ける。Nilotinib は 60mg/kg、コントロール群は同量の蒸留水をそれぞれ術後 2 週間から経口投与する。

1) Control rats that received vehicle (Sham) (n=10)

2) Control rats that received nilotinib (Sham-nilotinib) (n=10)

3) Rats with 5/6 nephrectomy that received vehicle (5/6Nx-Vehicle) (n=20)

4) Rats with 5/6 nephrectomy that received nilotinib (60 mg/kg/day) (5/6Nx-nilotinib) (n=20)

II. 8 週間口腔内投与後に屠殺前日夕方から翌日まで水分が自由に摂取できるメタボリック・ケージ内にて採尿後、麻酔下(エーテル)にて血液(心臓直接穿刺)及び腎臓その他組織を摘出し、治療効果を検討する。

III. 観察項目

1. 腎組織を H-E、PAS、Silver 染色にて比較

2. 腎組織で proliferative cell nuclear antigen (PCNA), rat monocyte and macrophage (ED-1), CD3, α -smooth muscle actin (α SMA), collagen type I の発現を

免疫組織染色で検討

3. 腎組織における collagen type I, TGF- β , fibronectin, PAI-1 mRNA の発現を real-time RT-PCR にて検討

4. 蛋白尿、血清 Cr、血圧、体重を経時的に測定

以上の項目を各群で比較検討し、ラット慢性腎不全モデル (5/6 腎摘ラット)におけるニロチニブの治療効果とその機序を解明する。さらに 5/6 腎摘ラットにおける生存率を治療群 (n=10)、未治療群 (n=10) で比較する。

1) Rats with 5/6 nephrectomy that received vehicle (5/6Nx-Vehicle)

2) Rats with 5/6 nephrectomy that received nilotinib (60 mg/kg/day) (5/6Nx-nilotinib)

術後 2 週間から経口投与を開始し、両群間の生存率に有意差を認めるかを検証する。

培養実験

腎線維芽細胞、メサンギウム細胞、近位尿細管細胞を用いて、主に次の事項を検討したい。

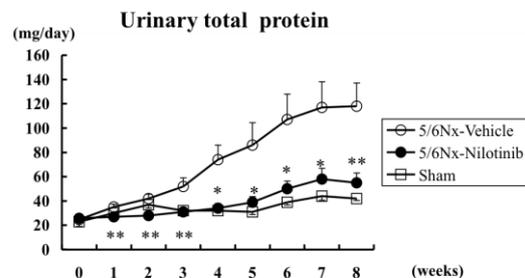
1. アンジオテンシン II、PDGF-BB 刺激による collagen type I, TGF- β の発現におけるニロチニブの抑制効果を real-time RT-PCR で検討

2. アンジオテンシン II、PDGF-BB 刺激による PDGF receptor, smad2/3, c-Abl のリン酸化を検討し、それらのニロチニブによる抑制効果を western blotting で検討

4. 研究成果

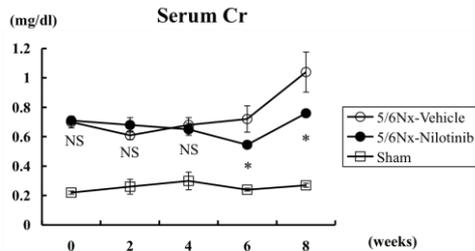
5/6 腎摘ラットにおいてニロチニブ投与にて有意に

1) 治療開始 1 週間からの蛋白尿の低下を認めた。

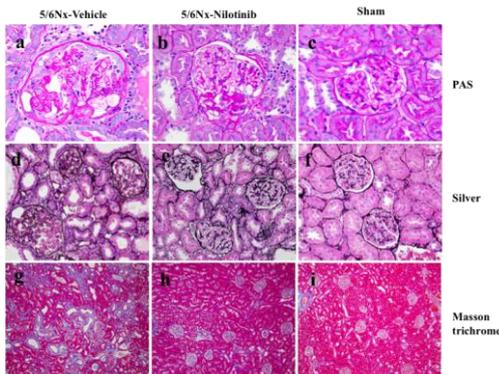


2) 腎重量の低下を認めた (2.09 ± 0.06 vs. 1.90 ± 0.08 g, $p < 0.05$).

3) 治療開始6週間からの血清Cr値の低下を認めた。 (8 weeks: 1.04 ± 0.15 vs. 0.76 ± 0.03 mg/dL, $p < 0.05$; 0.27 ± 0.01 mg/dL in sham-operated rats).

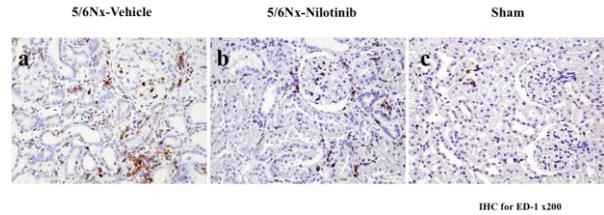


4) 糸球体硬化、尿細管障害の軽減を認めた。 Glomerulosclerosis (semiquantitative score (SEM-Q-S) (0-4): 1.57 ± 0.30 vs. 0.60 ± 0.20 , $p < 0.01$) Tubulointerstitial damage (SEM-Q-S (0-5): 3.20 ± 0.42 vs. 1.57 ± 0.23 , $p < 0.01$).



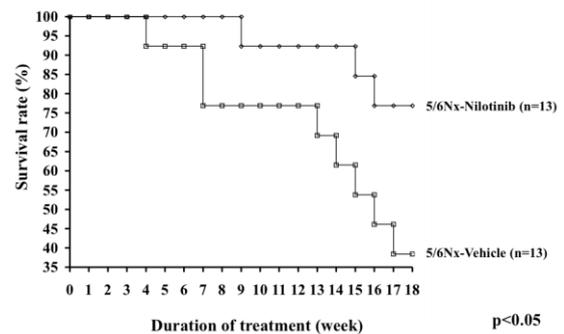
5) 腎皮質における線維化マーカーmRNA 発現低下を認めた。 collagen type I (collagen type I/GAPDH mRNA: 33.40 ± 6.90 vs. 14.60 ± 2.20 , $p < 0.01$), TGF- β (TGF- β /GAPDH mRNA: 7.40 ± 0.90 vs. 4.67 ± 0.57 , $p < 0.01$), fibronectin (fibronectin/GAPDH mRNA: 11.87 ± 1.53 vs. 8.48 ± 0.77 , $p < 0.05$), and PAI-1 (PAI-1/GAPDH mRNA: 8.56 ± 2.04 vs. 4.76 ± 0.71 , $p < 0.05$)

6) 間質における ED1+細胞(マクロファージ)の減少を認めた。



ED1+macrophage score (1.88 ± 0.28 vs. 1.07 ± 0.17 , $p < 0.01$).

7) 生存率の改善を認めた。



In vitro では腎線維芽細胞、メサンギウム細胞を用いた培養実験では、ニロチニブ前処置により、PDGF-BB による PDGFR β リン酸化抑制がみられた。

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1件)

1. Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Kuno Y, Akizawa T. Nilotinib attenuates renal injury and prolongs survival in rats with remnant kidney. J Am Soc Nephrol 22: 1486-96, 2011

[学会発表] (計3件)

1. Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Akizawa T: Nilotinib attenuates the progression of chronic renal failure in 5/6 nephrectomized rats. Asian Pacific

- Congress of Nephrology 2010 (June, Korea)
2. Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Kuno Y, Akizawa T: Nilotinib attenuates the progression of chronic renal failure in 5/6 nephrectomized rats. ERA-EDTA Congress 2010 (June, Munich)
 3. 伊與田雅之、柴田孝則、平井優紀、秋澤忠男. 5/6腎摘ラットにおけるニロチニブの腎不全進行抑制効果. 第53回日本腎臓学会学術総会 (2010年6月、神戸)

[図書] (計2件)

1. 伊與田雅之・柴田孝則・平井優紀・秋澤忠男. 腎炎の発症・進展におよぼすチロシンキナーゼ阻害薬の効果. Annual Review 2010, 99-106, 2010
2. 伊與田雅之・和田幸寛・秋澤忠男. 腎間葉線維化のメカニズム. BIO Clinica 26, 1085-9, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊與田 雅之 (IYODA MASAYUKI)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号：20384365

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：