

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590182

研究課題名(和文) アミノグリコシド腎毒性を導く初発分子の同定とそれを標的とした腎毒性防御法の最適化

研究課題名(英文) Identification of primary molecule leading to aminoglycoside-induced nephrotoxicity and optimization of molecular-targeted approach for preventing aminoglycoside toxicity

研究代表者

永井 純也 (NAGAI, Junya)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20301301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノグリコシド系抗生物質の腎障害と密接に関与する細胞内移行機構について精査した。培養腎上皮細胞を用いて解析した結果、これまで示されてきたエンドサイトーシス介在性輸送に加えて、エンドサイトーシスに依存しないゲンタマイシン(GM)の細胞内移行が認められた。そして、この輸送にはTRPVカチオンチャンネルが関与する可能性が示唆された。チャンネルを介してGMが細胞内に移行した場合、GMは直接細胞質に分布することでミトコンドリアに影響を及ぼしやすくなるため、細胞毒性の発現リスクが高まると予想される。以上より、TRPVチャンネル活性の変動がアミノグリコシド腎毒性の発現に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying entry of an aminoglycoside antibiotic gentamicin in renal proximal tubular cell lines OK and HK-2. In OK cells expressing a multi-ligand endocytic receptor megalin, gentamicin was taken up into the cells via endocytosis-dependent pathway. On the other hand, in HK-2 cells with little megalin expression, endocytosis-independent pathway, but not endocytosis-dependent pathway, was shown to be involved in gentamicin uptake. In addition, it was suggested that the endocytosis-independent uptake of gentamicin in HK-2 cells is, at least in part, due to transport via TRPV cation channel. When gentamicin is transported via a channel-dependent pathway into renal tubular cells, gentamicin directly enters the cytoplasm, where gentamicin potently affects mitochondrial function leading to cell death. Taken together, it is likely that activation of TRPV cation channel activity increases the risk of aminoglycoside-induced nephrotoxicity.

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：アミノグリコシド系抗生物質 腎毒性 腎移行 エンドサイトーシス チャンネル

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系抗生物質(以下、AG)は、 β -ラクタム系抗菌薬が作用しにくい緑膿菌やセラチア菌を含むグラム陰性菌に強力かつ確実な抗菌力を発揮することから、現在でも臨床において不可欠な抗菌薬である。また、安価であることから、世界的に見ても広く使用されている。さらに、近年、新規に開発された抗菌薬に対して耐性を有するグラム陰性菌が高頻度に出現していることから、臨床現場において AG の有用性が再認識されている。その一方で、AG の投与はしばしば腎障害や聴器障害を発症させるために、処方控えられられる場合が少なくない。したがって、臨床において AG を有効かつ安全に使用していくために、AG 投与による副作用を防御するための方法論の確立が強く求められている。

2. 研究の目的

現在、アミノグリコシド系抗生物質(以下、AG)の投与によって腎毒性が発現する主要なメカニズムとして、1)尿細管上皮細胞内に取り込まれた後、細胞内に蓄積することで細胞毒性を誘発する経路と、2)尿細管細胞膜に発現する calcium-sensing receptor に AG が細胞外で結合した後、シグナル伝達を介して細胞毒性が発現する経路が提唱されている。また、AG の細胞内移行は、これまでエンドサイトーシスによるものと考えられてきたが、最近では内耳細胞において、エンドサイトーシス非依存性のチャネルを介した輸送が関与することが示唆されている。しかし、腎尿細管上皮細胞におけるエンドサイトーシス非依存性輸送についての情報は無い。本研究では、AG 腎毒性の初発過程に関する分子機構を明確にするため、AG 輸送の分子機構を精査し、より効果的かつ確実な AG 腎毒性防御法の開発へと発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用機器・器具

培養器具として、35, 100 mm culture dish、35 mm glass bottom culture dish、24 well plate は岩城硝子のもを用いた。

実験に使用した機器・器具として、UV-160A Spectrophotometer (SHIMADZU)、液体シンチレーションカウンター : LSC-5100 (Aloka)、冷却遠心機 : AvantiTM 30 Centrifuge (BECKMAN)、卓上遠心機 : KN-70 (KUBOTA)、ポリトロン型ホモジナイザー : URTRA TARRAX® T25 basic (IKA LABORTECHNIK)、円偏光二色性 (Circular dichroism; CD) 測定装置 : J-720 Spectropolarimeter (Jasco)、核酸増幅リアルタイムモニタリングシステム : Line Gene (Bio Flux)、プログラムテンプレ

ントロールシステム : GeneQ Thermal Cycler (Bioer Technology)、電源装置 : AE-8300 クロスパワー150 (150 v/3.8) (ATTO)、泳動装置 : AE-6100, 6110 サブマージ アガロース電気泳動装置 (SHIMADZU)、核酸濃度測定器 : nano drop (ND-1000)、紫外可視分光光度計 : UV160A (SHIMADZU)、細胞内 Ca^{2+} 測定装置 : ARGUS/HiSCA system (浜松ホトニクス)、蛍光顕微鏡 : Nikon ECLIPSE TE300 (Nikon) を用いた。

(2) 細胞培養

OK cells : OK 細胞は、10% FBS を含む M199 を用い、 CO_2 インキュベーター内 ($37^{\circ}C$ 、5% CO_2 -95% air) で 90%コンフルエントになるまで 5-7 日間培養した。細胞の継代は 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 4Na を用いて細胞を剥離し 100 mm culture dish (継代用) に $60-100 \times 10^4$ cells/dish となるように播種した。24 well plate (実験用) には 5×10^4 あるいは 8×10^4 cells/dish となるように播種した。培地交換は 2 日毎に行い、実験あるいは継代前日にも行った。実験には 5-7 日間培養した細胞 (passage #92-104) を用いた。

HK-2 cells : HK-2 細胞は、10% FBS を含む DMEM/F-12 を用い、 CO_2 インキュベーター内 ($37^{\circ}C$ 、5% CO_2 -95% air) で 90%コンフルエントになるまで 5-7 日間培養した。細胞の継代は 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 4Na を用いて細胞を剥離し 100 mm culture dish (継代用) に $60-100 \times 10^4$ cells/dish となるように播種した。35 mm glass bottom culture dish (実験用)、24 well plate (実験用) にはそれぞれ 5000 cells/dish、 5×10^4 cells/dish となるように播種した。培地交換は 2 日毎に行い、実験あるいは継代前日にも行った。実験には 5-7 日間培養した細胞 (passage #18-46) を用いた。

(3) [3H]Gentamicin の細胞内移行特性解析

実験には以下の phosphate-buffered saline (PBS) あるいは HEPES buffer を用いた。培地を除去した細胞を PBS(G) あるいは HEPES buffer 1 mL で 3 回洗浄し、 $37^{\circ}C$ または $4^{\circ}C$ の PBS(G) あるいは HEPES buffer で 12-30 分間プレインキュベーションした。その後、プレインキュベーション溶液を除いて [3H]gentamicin 溶液を 0.3 mL 添加し、一定時間インキュベーションした。基質溶液を除去した後に氷冷した PBS(+) 1 mL で 3 回洗浄した。取り込み実験直後の細胞に氷冷 PBS(+) を加えてセルスクレーパーでかきとり $4^{\circ}C$ 、10,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を除去し再び PBS(+) を加えて $4^{\circ}C$ 、10,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、0.1 M NaOH (0.3 mL) を加えて細胞を溶解し、その細胞溶解液に Ultima Gold を 3 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。また、細胞溶解液 45 μ L を用いて Bradford 法にてタンパク量を測定した。

4. 研究成果

(4) 薬物処理

Sodium azide、2,4-dinitrophenol、chlorpromazine、各種アミノグリコシド、N-WASP 関連ペプチドは PBS(G) に、cytochalasin D、colchicine は 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む PBS(G) に溶解した。Gadolinium、ruthenium red、probenecid は HEPES buffer に、capsaicin、resiniferatoxin、capsazepine、wortmannin、cinnamaldehyde、carvacrol、6-tert-butyl- m-cresol は 0.5% DMSO を含む HEPES buffer に溶解した。各阻害剤及び刺激剤はプレインキュベーション後より基質と共存させて添加した。阻害剤はプレインキュベーション時から添加し、基質とも共存させてインキュベーションした。

(5) RT-PCR 法

RNA の抽出は、細胞から培地を除去した後、PBS(-) で 2 回洗浄し、RNeasy Mini Kit を用いて取扱い説明書に記載されたプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した RNA 濃度は nano drop (ND-1000) を用いて 260 nm における吸光度を測定することで算出した。RT-PCR は、RT-PCR Kit (Rever Tra Dash™) を用い、取扱い説明書に記載されたプロトコールに従い行った。逆転写反応は、65°C 5 分 (RNA の高次構造分解)、4°C 5 分の後、逆転写酵素 (Rever Tra Ace™) を加え、42°C 30 分 (伸長反応)、99°C 5 分 (逆転写酵素の熱変性)、4°C 5 分を行った。PCR 反応は以下に示す条件にて行った。1 サイクル目の denaturation の際に DNA 合成酵素 (KOD Dash™) を加えた (ホットスタート法)。

(6) アガロースゲルによる電気泳動

アガロースに TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) を加え、2% のアガロースゲルを作成した。電気泳動後、buffer に ethidium bromide を 0.1 µg/mL となるように加え、40-45 分間染色した。その後、UV トランスイルミネーターを用いて増幅された DNA のバンドを観察した。

(7) 細胞内カルシウムイオン濃度の測定

細胞内カルシウムイオン濃度を測定するために、HK-2 細胞を 35 mm glass bottom dish に 5000 cells/dish で播種し、50~60% コンフルエントになるまで培養した。培地を除去した後、HEPES buffer で 3 回洗浄し、10 µM Fura-2-AM を含む HEPES buffer を添加して 37°C で 40 分間インキュベーションした。その後細胞を HEPES buffer で 3 回洗浄し、室温 (24~26°C) のチャンバー内でインキュベーションした。340 nm 及び 380 nm の波長で励起した際の Fura-2 の蛍光を測定し、蛍光強度比 (F340 nm/F380 nm) を細胞内カルシウム濃度の相対的な指標とした。

最初に、本実験で用いたヒト培養腎尿細管上皮細胞 HK-2 の一般的な特性について、解析した。まず、D-グルコースの取り込みには Na 依存性が観察され、また、SGLT1 および SGLT2 の mRNA の発現が認められた。さらに、P-糖タンパク質基質である rhodamine 123 の細胞内蓄積は P-糖タンパク質阻害剤である verapamil によって有意に上昇するとともに、MDR1 遺伝子の発現も認められた。従って、本研究で用いた HK-2 細胞は比較的良好に腎近位尿細管上皮細胞の機能特性を維持していることが示された。

次に、HK-2 細胞におけるメガリンの発現について調べた。RT-PCR 解析の結果、30 サイクルで検討した場合には、メガリン mRNA 由来のバンドは全く観察されなかった。さらに、サイクル数を増やして 35 サイクルで行った場合において、バンドは観察されたものの、その発現レベルは高いものではなかった。また、ウエスタンブロット解析を行った結果、ポジティブコントロールとして用いたラット卵黄嚢ガン由来の L2 細胞では明確なメガリンの発現が認められたが、HK-2 細胞においてはほとんど発現が観察されなかった。一方、フクロネズミ腎尿細管由来の OK 細胞ではメガリンの発現が明確に認められた。

そこで本研究では、メガリンが発現していない HK-2 細胞とメガリンが発現している OK 細胞とで [³H]gentamicin の取り込みを比較解析しながら検討を行うこととした。まず、 [³H]gentamicin 取り込み過程の特異性について明確にするため、非標識体 gentamicin による影響について検討した。その結果、 [³H]gentamicin 取り込みはいずれの細胞においても、非標識ゲンタマイシンの共存によって濃度依存的に阻害されることが認められた。

次に、エネルギー代謝阻害剤である 2,4-dinitrophenol の影響について検討した。その結果、OK 細胞においては、2,4-dinitrophenol によって有意に阻害されたが、HK-2 細胞における [³H]gentamicin 取り込みには影響が認められなかった。

また、細胞骨格系機能タンパク質の阻害剤であり、エンドサイトーシス全般を阻害するとされる、colchicine および cytochalasin D の影響について検討した。その結果、OK 細胞における [³H]gentamicin 取り込みはいずれの阻害剤によっても有意に低下したが、HK-2 細胞では影響が認められなかった。したがって、HK-2 細胞における gentamicin 取り込みはエンドサイトーシスに依存しないことが示された。

さらに当研究室でメガリンリガンドであることを見出ししている、塩基性ペプチド N-WASP181-200 の影響について検討した。その結果、OK 細胞では濃度依存的な阻害効果が観察されたが、HK-2 細胞では有意な阻害効果

は観察されなかった。

ここまで示した結果をまとめると、フクロネズミ腎尿細管由来 OK 細胞では、メガリンが発現しており、メガリン介在性エンドサイトーシスによって gentamicin が細胞内に取り込まれることが示された一方、ヒト腎尿細管由来 HK-2 細胞では、メガリンの発現は観察されず、そしてエンドサイトーシスによる gentamicin 取り込みは認められなかった。しかし、HK-2 細胞においても非標識 gentamicin によって阻害されたことから、その細胞内移行に何らかの担体が関与しているものと考えられた。

最近、内耳有毛細胞において transient receptor potential カチオンチャンネル (TRP チャンネル) が gentamicin の細胞内移行に関与している可能性が報告されている。そこで、HK-2 細胞における ^3H gentamicin 取り込みにカチオンチャンネルが関与するかどうかについて解析を進めた。最初に、非選択的カチオンチャンネル阻害剤であり、種々の TRP チャンネルを阻害することが報告されている ruthenium red の影響について検討した。その結果、HK-2 細胞における ^3H gentamicin 取り込みは ruthenium red の共存によって有意に阻害された。

次に、TRPV1 アゴニストである capsaicin および resiniferatoxin の影響について検討した。なお、TRP チャンネルの機能を確認するため、細胞内カルシウム濃度の変化についても検討を行った。その結果、HK-2 細胞における ^3H gentamicin 取り込みは、いずれの TRPV1 アゴニストによっても影響されなかった。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度にも変化が認められず、HK-2 細胞において TRPV1 は機能しておらず、gentamicin 取り込みにも関与していないものと考えられた。

その一方で、TRPV1 アンタゴニストである capsazepine による影響について検討したところ、100 μM で顕著な ^3H gentamicin 取り込みの促進効果が観察されるとともに、その濃度の処理により細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。

さらに、TRPV2 アゴニストである probenecid、TRPV3 アゴニストである carvacrol および 6-tert-butyl-m-cresol (TBMC) の影響についても検討した。その結果、probenecid は細胞内カルシウム濃度および ^3H gentamicin 取り込みには影響が認められない一方で、細胞内カルシウム濃度上昇が観察された carvacrol および TBMC は、 ^3H gentamicin 取り込みを上昇させることが認められた。

また、TRPV チャンネルのモジュレーターである gadolinium の影響について調べました。その結果、0.3 mM gadolinium は比較的早い取り込み時間から ^3H gentamicin 取り込みを有意に上昇させることが観察されるとともに、細胞内カルシウム濃度も上昇させることが認められた。

さらに、HK-2 細胞における ^3H gentamicin 取り込みに及ぼす gadolinium 共存および前処理の影響について比較した。gadolinium 共存下における ^3H gentamicin 取り込みは、低濃度 gadolinium 共存下においては上昇し、高濃度 gadolinium 共存下においては阻害される二相性が観察されました。一方、gadolinium を前処理した後に ^3H gentamicin 取り込み実験を行った場合には、 ^3H gentamicin 取り込みは gadolinium 前処理濃度依存的に上昇し、共存時において観察された二相性は認められなかった。

また、OK 細胞における ^3H gentamicin 取り込みに関しても同様の条件で検討した。その結果、gadolinium 共存下においては ^3H gentamicin 取り込みに二相性の変化が観察され、前処理において高濃度においても有意な上昇が認められた。

次に、gadolinium 前処理によって促進される ^3H gentamicin 取り込みに及ぼす、gadolinium キレート剤の影響について検討しました。すなわち、gadolinium を前処理後、キレート剤ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) を含む buffer で細胞を洗浄し、取り込み実験を行った。その結果、gadolinium 前処理によって促進された ^3H gentamicin 取り込みは、DTPA によって有意に減少した。続いて、ruthenium red 共存による影響について検討した。その結果、gadolinium 前処理によって促進された ^3H gentamicin 取り込みは、ruthenium red によりほぼ完全に抑制され、gadolinium 処理により促進される ^3H gentamicin 輸送にカチオンチャンネルが関与する可能性が示唆された。

さらに、当研究室において、無血清培地で 72 時間処理することで HK-2 細胞における ^3H gentamicin 取り込みが有意に上昇することを認めていたことから、その細胞における TRPV の mRNA 発現変化について検討した。その結果、TRPV3 の mRNA 発現が上昇していることを認めた。

以上の結果より、腎尿細管上皮細胞において、これまで示されてきたエンドサイトーシス経路に加えて、それとは異なる経路による gentamicin 取り込みが観察され、AG の腎移行にはメガリン以外の経路も関与する可能性が示唆された。そして、そのエンドサイトーシス非依存性輸送には、TRPV チャンネルが関与する可能性が示唆された。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた場合、AG は一旦リソソームに蓄積することになる。一方、TRPV チャンネルを介して輸送された場合、ミトコンドリアへのアクセスが容易な細胞質内に AG が直接移行することになるため、細胞毒性発現のリスクが顕著に高まると予想される。したがって、今後は病態時やある種の薬物投与時における TRPV チャンネル活性の変動と AG 腎毒性発現の関連性についても考えていく必要があるものと思われる。これらの知見は、アミノグリコシド腎毒性防御を

考える上でも有用な情報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8件)

1. Junya Nagai, Mikihiisa Takano. Entry of aminoglycosides into renal tubular epithelial cells via endocytosis-dependent and endocytosis-independent pathways. *Biochem Pharmacol*, 査読有, in press, 2014.
doi: 10.1016/j.bcp.2014.05.018
2. Junya Nagai, Takuji Komeda, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Effect of protamine on gentamicin accumulation in opossum kidney epithelial cells. *J Pharm Pharmacol*, 査読有, 65:441-446, 2013.
doi: 10.1111/jphp.12005
3. Junya Nagai, Ayaka Yamamoto, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Albumin overload induces expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and its target genes in HK-2 human renal proximal tubular cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 434:670-675, 2013.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.140
4. Junya Nagai, Takuji Komeda, Yuki Katagiri, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Characterization of protamine uptake by opossum kidney epithelial cells. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 36:1942-1949, 2013.
doi: 10.1248/bpb.b13-00553
5. Saori Mimaki, Junya Nagai, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Pharmacokinetics of FITC-labeled immunoglobulin G in normal mice and mice with cisplatin-induced acute kidney injury. *Current Topics in Pharmacology*, 査読有, 17:25-32, 2013.
http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=11&in=1&vn=17&type=3
6. Junya Nagai, Megumi Kimura, Yumi Okada, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Effect of gadolinium on endocytic uptake of albumin in cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *Current Topics in Pharmacology*, 査読有, 17:33-44, 2013.
http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=11&in=1&vn=17&type=3

7. Takeshi Sawada, Junya Nagai, Yumi Okada, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Gadolinium modulates gentamicin uptake via an endocytosis-independent pathway in HK-2 human renal proximal tubular cell line. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 684:146-153, 2012.
doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.030.
8. Junya Nagai, Koya Sato, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Megalin/cubilin-mediated uptake of FITC-labeled IgG by OK kidney epithelial cells. *Drug Metab Pharmacokin*, 査読有, 26:474-485, 2011.
doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-022

[学会発表](計9件)

1. 田邊敬明、永井純也、澤田健史、湯元良子、高野幹久、培養腎上皮細胞におけるゲンタマイシン取り込みに及ぼすガドリニウムの影響、日本薬剤学会第28年会、平成25年5月23~25日、名古屋
2. 米田卓司、永井純也、湯元良子、高野幹久、培養腎上皮細胞OKにおけるプロタミンの取り込み特性、日本薬物動態学会第27回年会、平成24年11月20日~22日、東京
3. 木村愛、永井純也、湯元良子、高野幹久、ヒト腎近位尿管由来培養細胞におけるエンドサイトーシスに及ぼすガドリニウムの影響、第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、平成24年11月10日~11日、松江
4. 永井純也、澤田健史、田邊敬明、湯元良子、高野幹久、ヒト腎近位尿管由来細胞HK-2におけるメガリン非依存性のゲンタマイシン輸送特性、日本薬剤学会第27年会、平成24年5月24~26日、神戸
5. 永井純也、岡田結実、澤田健史、湯元良子、高野幹久、ヒト腎近位尿管上皮細胞由来HK-2におけるアルブミンとゲンタマイシンの取り込み特性、日本薬学会第132年会(平成24年3月28~31日、札幌)
6. Takeshi Sawada, Junya Nagai, Ryoko Yumoto, Mikihiisa Takano. Effects of TRPV cation channel modulators in gentamicin uptake in the human kidney epithelial cell line HK-2. 日本薬物動態学会第26回年会、平成23年11月16~18日、広島
7. 永井純也、三牧沙織、湯元良子、高野幹久、腎におけるmRNAおよびmicroRNA発現に及ぼすゲンタマイシン投与の影響、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、平成23年11月12~13日、高松
8. Junya Nagai, Mikihiisa Takano, Receptor-targeted prevention of

aminoglycoside accumulation and toxicity in the kidney、日本薬学会第26年会、平成23年5月29～31日、東京

9. 米田卓司、澤田健史、湯元良子、永井純也、高野幹久、ゲンタマイシンの腎尿管刷子縁膜結合および細胞内取り込みに及ぼすプロタミンの影響、日本薬学会第26年会、平成23年5月29～31日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 純也 (NAGAI, Junya)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20301301