

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670081

研究課題名(和文) mTOR阻害薬の非侵襲薬効評価系としての尿中LC3定量評価システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of quantification system for human urinary LC3 as a noninvasive pharmacological evaluation system of mTOR inhibitor

研究代表者

増田 智先 (MASUDA, Satohiro)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90303825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーはアミノ酸の再利用を経て細胞死を免れる飢餓への適応であり、mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性阻害によっても引き起こされ、その指標としてLC3の発現が知られている。本研究では、ヒト尿中のLC3漏出量を数値化できる測定系の構築に成功した。尿中のLC3は腎臓を構成する細胞由来であり、腎臓におけるオートファジーの状態を非侵襲的にモニタリングできる画期的な技術である。虚血再灌流障害を受けている移植腎組織の状態、オートファジーを誘導するmTOR阻害薬を投与した際の人における薬理効果のモニタリングシステムとして将来の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an adaptation to starvation that escapes cell death through the reuse of amino acids, and is also activated by the inhibition of mTOR (mammalian target of rapamycin) activity. The increase of LC3 expression is well known as an indicator of autophagy. In the present study, a measurement system capable of quantifying the leakage of LC3 in human urine has been successfully established. LC3 in the urine is derived from cells constituting the kidney, and is an epoch-making technology that can noninvasively monitor the state of autophagy in the kidney. It is expected to be applied in the future as a state of the transplanted kidney tissue undergoing ischemia reperfusion injury and a pharmacological effect in human kidneys when mTOR inhibitors those induces autophagy is administered.

研究分野：医療系薬学

キーワード：バイオマーカー mTOR阻害薬 オートファジー 薬剤性腎障害 慢性腎臓病 腎臓移植

1. 研究開始当初の背景

mTOR (mammalian target of rapamycin) は生物界に広く存在し、細胞の増殖活性を促す役割を有し、阻害薬は抗がん薬 (癌細胞の増殖抑制) や免疫抑制薬 (リンパ球の増殖抑制) として最近注目を浴びている(1)。一方、オートファジー (自食) は、不要タンパク質や老化ミトコンドリアの自己消化とアミノ酸の再利用という経路を経て細胞死を免れるシステムであり、飢餓への適応とも考えられている(2)。

慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) は様々な要因に端を発し、経時的に腎の病変が進行したもので、糸球体や間質の高度な線維化を特徴とする。申請者らは、慢性腎不全の進展過程を反映するモデルラットとして汎用される 5/6 腎摘出ラット (腎垂全摘ラット) を用いて、腎組織病変の進展に伴う腎内 mTOR の活性化 (S36 キナーゼのリン酸化) と mTOR 阻害薬エベロリムス投与による治療効果を見出した(3)。さらに、mTOR 阻害薬の投与によって細胞内オートファジーが活性化し、その指標とされる LC3 タンパク質を尿中にも検出した(4) (Fig. 1)。

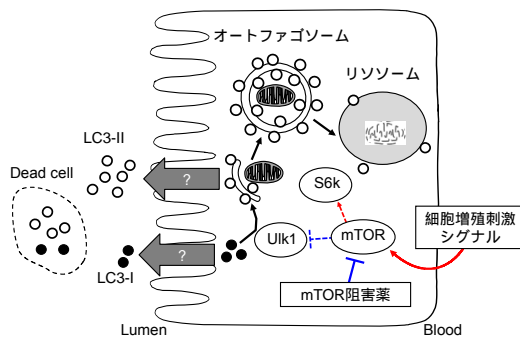


Fig. 1. 近位尿管上皮細胞におけるmTOR活性の阻害に伴うオートファジーの活性化、LC3タンパク質の産生と活性化 (LC3-I→LC3-II)

そこで本研究では、尿中 LC3 を定量的に評価できれば、恒常的に mTOR 経路が活性化した慢性腎臓病患者に対し、mTOR 阻害薬を投与した後の腎組織内における薬効 (mTOR の阻害の程度) を非侵襲的に評価できるという発想につながった。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、尿中 LC3 の分析系を構築し、mTOR 阻害薬の薬効を反映する指標としての有用性について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 被験者

九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より「臨床で有用性の高い薬剤性腎障害バイオマーカーの探索に関する研究 (許可番号 588)」を得た上で腎臓移植予定の患者より同意を取得した。

2014年10月から2017年1月の期間にお

いて35名の患者から同意を得、述べ1143検体の尿試料を回収することができた。

(2) 尿中 LC3 の測定法構築

尿中 LC3 の測定には、Human LC3A DuoSet ELISA (R&D Systems 社: DY8558-05) を用いて測定した。まず、96 well プレートに捕捉用抗体を 100 μL/well 添加し、プレートをシールで覆い、25 °C 14 時間以上反応させた。その後、0.05 % Tween 20 in PBS (PBS-T) 300 μL/well で 3 回洗浄後、1% BSA 100 μL/well を用いて 25 °C で 1 時間インキュベートした。

0.05 % PBS-T 300 μL/well で 3 回洗浄した後、濃度未知の尿試料を 100 μL/well を添加した。既知濃度の LC3 標準曲線は 8 ポイントで作成し、100 μL/well で添加後、25 °C で 2 時間インキュベートした。

0.05 % PBS-T 300 μL/well で 3 回洗浄した後、ビオチン標識 LC3 抗体 100 μl を各ウェルに添加し、25 °C で 2 時間インキュベートした。

0.05% PBS-T 300 μL/well で 3 回洗浄した後、Streptavidin-HRP (R&D Systems) を 1% BSA で希釈後 100 μL/well を添加し、遮光下で 25 °C 20 分インキュベートした。0.05% PBS-T 300 μL/well で 3 回洗浄した後、TMB 液 (R&D Systems) 100 μL/well を添加し、遮光下で 25 °C 20 分インキュベートした。2N H₂SO₄ 50 μL を各 well に添加後、プレートを軽く叩き、試薬を十分に混合し、吸光度計 (450 nm, 570 nm) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト LC3 ELISA 系の構築

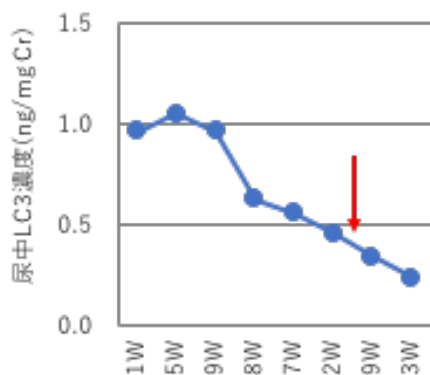
我々は既に、ラット尿中に漏出してくる LC3 の測定系を構築している。慢性腎不全モデルラットに mTOR 阻害薬であるエベロリムスを投与した場合、尿中の LC3 漏出量が増大し、循環血中から腎組織中に移行したエベロリムスの mTOR 阻害活性をオートファジーの活性化という側面から評価できると考えられた。本研究では、それをヒト、すなわち術後にエベロリムスを投与される可能性の高い腎移植患者を対象に測定系を構築し、ラットで見出された尿中 LC3 量と腎組織中のエベロリムス活性の関連性を明らかにすることを目的とした。市販の抗 LC3 抗体を計 6 種類購入し、ビオチン-アビジン反応系を応用した自前の ELISA 系の構築を試みた。すべての市販抗体を用いて検討を繰り返したが、ラット尿で得られた結果を反映するような直線性と再現性は得られなかった。このような LC3 測定系構築のための試行錯誤を繰り返している中で、ヒト LC3 に対する ELISA キットが市販されることとなり、それらを用いた検討へと切り替えることとした。ヒト尿の希釈倍率、保管状態等の条件検討を繰り返し、最終的にはヒト尿中、特に腎移植患者尿中の LC3 測定系を樹立することができた。

(2) 腎移植患者の尿中 LC3 漏出の検出と経時的変化

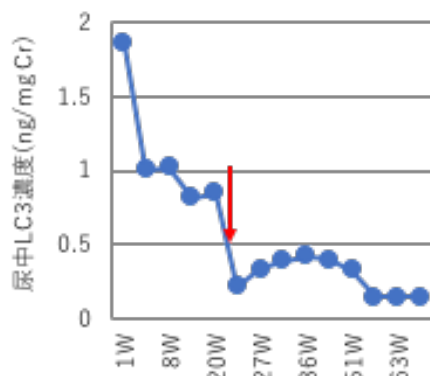
生体腎移植患者の尿中 LC3 の定量を試み、エベロリムス投与前と投与開始後で尿中 LC3 漏出量が増大すると想定した上で検討を進めた。本稿にはスペースの都合上、また現段階で未発表の結果であることを踏まえて、3 症例についてその経時的な変化の結果を示すこととする。

症例 A は、生体腎移植術後 55 週目、慢性移植腎症の発現リスクの高まる時期からエベロリムスの投与が開始（赤矢印）された症例である。症例 B は生体腎移植術後 18 週という比較的早期よりエベロリムスの投与が開始（赤矢印）された症例である。

・症例 A



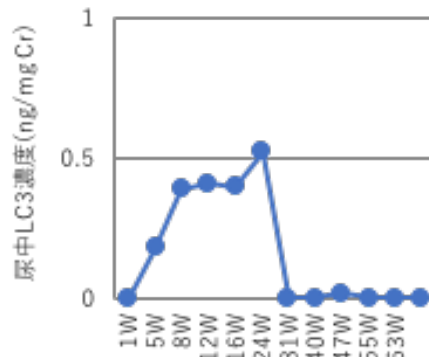
・症例 B



一方、症例 C はエベロリムスが投与されていない症例、すなわちエベロリムス投与の有無という点から陰性対照として考えることができる。

これら 3 症例に共通することは、エベロリムスの投与の有無にかかわらず生体腎移植術直後より、尿中に LC3 の漏出が検出されるということ、緩徐ではあるが、術後の経過日数を重ねるに従ってその漏出量は減少することが認められる。また、症例 A や B

・症例 C



のようにエベロリムスの投与が開始されても尿中の LC3 漏出量は影響を受けないこと、その傾向はエベロリムスの投与を受けていない症例 C に置いても同様であることが示された。

(3) これらの結果から、少なくとも次の 2 点については考察可能と考えられる。

移植片に用いられたグラフト腎組織は、移植後に血流が再開されることによる虚血再灌流障害を受け、活性酸素等による細胞毒性を受けること、経時的な障害からの回復と尿中 LC3 漏出量の低下が良好な対応を示すことから、尿中 LC3 は移植腎の虚血再灌流障害の程度を反映する可能性があると考えられる。

エベロリムスの投与を開始しても尿中 LC3 漏出量の明らかな増大は認められなかったことから、臨床用量のエベロリムスは腎組織におけるオートファジーの顕著な活性化を促すには至らないため、in vivo 個体レベルでの LC3 の産生と漏出という現象に結びつかなかったと考えられる。

(4) エベロリムスの副作用の一つとして、腎糸球体における足細胞として糸球体濾過を調節する細胞ポドサイトの障害に伴う尿蛋白の増加（ネフローゼ様症状）が知られているが、少なくとも生体腎移植症例における投与開始から 50 週末満の条件下においては、その様な副作用発現並びにそれを反映する尿中 LC3 漏出量の増大には至らないことが示唆された。一方、長期間にわたりエベロリムスの類薬である別の mTOR 阻害薬シロリムスを投与されている心臓移植患者では、ネフローゼ様症状を呈する患者の存在が知られている (5)。さらに、実験的条件においても同様にシロリムス投与による尿タンパクの上昇が観察されている (6)。従って、約 1 年にわたりエベロリムスを投与された腎移植患者において、タンパク尿が顕在しなかったという点は、臨床用量のエベロリムスはシロリムスと異なり、タンパク尿を引き起こす危険性が同等以下である可能性が見られた。

(5) 本研究では、世界で初めて尿中の LC3 漏出量を定量数値化できるシステムの構築に成功しただけでなく、実際にオートファジーを誘引する可能性のある薬物を投与されている腎移植患者の尿を用いた検討を行うことによって、臨床用量のエベロリムスの引き起こす副作用発現（尿タンパクの増大）のモニタリングにも応用可能な分析系であることの一端を示すことができた。今後さまざまな症例を対象に検討を進めることによって、本分析系の臨床上の有用性をさらに明確にできるとともに、これまで不明であった mTOR 阻害薬の新しい効果、副作用の非侵襲検出系として確立することが期待される。

引用文献

Huber, T. B.; Walz, G.; Kuehn, E. W.: mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. ***Kidney Int***, 79: 502-11, 2011

Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B.: Methods in mammalian autophagy research. ***Cell***, 140: 313-26, 2010

Nakagawa S, Masuda S, Nishihara K & Inui K: mTOR inhibitor everolimus ameliorates progressive tubular dysfunction in chronic renal failure rats. ***Biochem Pharmacol***, 79: 67-76, 2010

Nakagawa S, Nishihara K, Inui K & Masuda S: Involvement of autophagy in the pharmacological effects of the mTOR inhibitor everolimus in acute kidney injury. ***Eur J Pharmacol***, 696: 143-54, 2012

Aliabadi, A. Z.; Pohanka, E.; Seebacher, G.; Dunkler, D.; Kammerstatter, D.; Wolner, E.; Grimm, M.; Zuckermann, A. O., Development of proteinuria after switch to sirolimus-based immunosuppression in long-term cardiac transplant patients. ***Am J Transplant*** 2008, 8, (4), 854-61

Torras, J.; Herrero-Fresneda, I.; Guliás, O.; Flaquer, M.; Vidal, A.; Cruzado, J. M.; Lloberas, N.; Franquesa, M.; Grinyo, J. M., Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage? ***Nephrol Dial Transplant*** 2009, 24, (12), 3632-40.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Shipkova, M.; Hesselink, D. A.; Holt, D. W.; Billaud, E. M.; van Gelder, T.; Kunicki, P. K.; Brunet, M.; Budde, K.;

Barten, M. J.; De Simone, P.; Wieland, E.; Lopez, O. M.; Masuda, S.; Seger, C.; Picard, N.; Oellerich, M.; Langman, L. J.; Wallemacq, P.; Morris, R. G.; Thompson, C.; Marquet, P., Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus: A Consensus Report. ***Ther Drug Monit*** **2016**, 38, (2), 143-69.

Kajiwara, M.; Masuda, S., Role of mTOR Inhibitors in Kidney Disease. ***Int J Mol Sci*** **2016**, 17, (6), E975.

Nakagawa, S.; Nishihara, K.; Miyata, H.; Shinke, H.; Tomita, E.; Kajiwara, M.; Matsubara, T.; Iehara, N.; Igarashi, Y.; Yamada, H.; Fukatsu, A.; Yanagita, M.; Matsubara, K.; Masuda, S.,

Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease. ***PLoS One*** **2015**, 10, (8), e0136994.

Uesugi, M.; Kikuchi, M.; Shinke, H.; Omura, T.; Yonezawa, A.; Matsubara, K.; Fujimoto, Y.; Okamoto, S.; Kaido, T.; Uemoto, S.; Masuda, S., Impact of cytochrome P450 3A5 polymorphism in graft livers on the frequency of acute cellular rejection in living-donor liver transplantation. ***Pharmacogenet Genomics*** **2014**, 24, (7), 356-66.

Tsuchimoto, A.; Shinke, H.; Uesugi, M.; Kikuchi, M.; Hashimoto, E.; Sato, T.; Ogura, Y.; Hata, K.; Fujimoto, Y.; Kaido, T.; Kishimoto, J.; Yanagita, M.; Matsubara, K.; Uemoto, S.; Masuda, S., Urinary Neutrophil

Gelatinase-Associated Lipocalin: A Useful Biomarker for

Tacrolimus-Induced Acute Kidney Injury in Liver Transplant Patients. ***PLoS ONE*** **2014**, 9, (10), e110527.

Sato, E.; Hashi, S.; Taniguchi, R.; Yano, I.; Matsubara, K.; Ogawa, E.;

Yoshizawa, A.; Okamoto, S.; Uemoto, S.; Masuda, S., Effectiveness of everolimus in combination with cyclosporine as treatment for chronic rejection in a pediatric patient undergoing liver transplantation. ***Jp J Ther Drug Monitor*** **2014**, 31, (1), 1-5.

Mizuno, T.; Fukuda, T.; Masuda, S.;

Uemoto, S.; Matsubara, K.; Inui, K.; Vinks, A. A., Developmental trajectory of intestinal MDR1/ABCB1 mRNA expression in children. ***Br J Clin Pharmacol*** **2014**, 77, (5), 910-2.

Mishima, E.; Inoue, C.; Saigusa, D.; Inoue, R.; Ito, K.; Suzuki, Y.; Jinno, D.; Tsukui, Y.; Akamatsu, Y.; Araki, M.; Araki, K.; Shimizu, R.; Shinke, H.; Suzuki, T.; Takeuchi, Y.; Shima, H.;

Akiyama, Y.; Toyohara, T.; Suzuki, C.; Saiki, Y.; Tominaga, T.; Miyagi, S.; Kawagishi, N.; Soga, T.; Ohkubo, T.; Yamamura, K.; Imai, Y.; Masuda, S.; Sabbisetti, V.; Ichimura, T.; Mount, D. B.; Bonventre, J. V.; Ito, S.; Tomioka, Y.; Itoh, K.; Abe, T., Conformational Change in Transfer RNA Is an Early Indicator of Acute Cellular Damage. *J Am Soc Nephrol* **2014**, 25, (10), 2316-2326.

〔学会発表〕(計 13 件)

増田智先、薬毒物による腎障害検出のための尿中バイオマーカーの探索、医療薬学フォーラム 2016/第 24 回クリニカルファーマシーシンポジウム、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、2016 年 6 月 26 日、シンポジウム

増田智先、カルシニューリン阻害薬：肝移植領域、第 25 回 日本医療薬学会年会、パシフィコ横浜、2015 年 11 月 22 日、シンポジウム

増田智先、"Impact of renal system mediating detoxification and onco-nephrology" (がん化学療法における腎異物排泄機構の重要性)、第 30 回日本薬物動態学会、東京、タワーホール船堀、2015 年 11 月 12 日、シンポジウム

S. Masuda, M. Kajiwara, A Tsuchimoto, H. Shinke, M. Uesugi, Uemoto, K. Matsubara, Identification of a useful biomarker for tacrolimus-induced nephrotoxicity in liver transplant patients, "Urine Omics & 2nd International Caparica Conference In Translational Nephrology", Caparica, Lisbon, 2015 年 9 月 29 日、招待 oral presentation
S. Masuda, Role of OCT2/MATEs interplay in drug-induced nephrotoxicity, BioMedical Transporters Conference 2015, Lugano, Switzerland, 2015 年 8 月 13 日、シンポジウム

増田智先、臓器移植領域におけるエベロリムスの TDM、第 32 回日本 TDM 学会・学術大会、キッセイ文化ホール(長野県松本文化会館)、2015 年 5 月 23 日、シンポジウム

増田智先、薬物の腎挙動に関わるトランスポーター、第 35 回 日本臨床薬理学会年会学術総会、ひめぎんホール(愛媛県民文化会館)、2014 年 12 月 5 日、シンポジウム

増田智先、エベロリムスの TDM による個別投与、第 41 回臓器保存生物医学会、千里ライフサイエンスセンター、2014 年 11 月 29 日、シンポジウム

増田智先、奥田有紀、西岡由貴、菊池実緒、上杉美和、端 幸代、中川俊作、松原和夫、上田佳秀、千葉 勉、海道利実、上本伸二、

肝移植後 C 型肝炎最年少例におけるテラプレビルとシクロスポリンとの相互作用、第 24 回日本医療薬学会年会、名古屋国際会議場、2014 年 9 月 27 日、シンポジウム
増田智先、mTOR 阻害薬の可能性、第 39 回西日本薬剤学研究会、九州地区国立大学九重共同研修所、2014 年 8 月 29 日、特別講演

増田智先、カルシニューリン阻害薬の臨床薬理—個別化投与設計法の確立を目指して—、生体機能と創薬シンポジウム 2014、近畿大学東大阪キャンパス、2014 年 8 月 28 日、シンポジウム

増田智先、腎機能低下のバイオマーカー：探索から臨床応用にむけて、第 7 回福岡腎と薬剤研究会、福岡市薬剤師会、2014 年 8 月 4 日、特別講演

増田智先、臓器移植における mTOR 阻害薬の可能性、第 11 回 Kidney Transplant Fraternity by Urologist、ステーションコンファレンス東京、2014 年 4 月 12 日、特別講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 智先 (MASUDA, Satohiro)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90303825

(2) 研究協力者

梶原 望渡 (KAJIWARA, Moto)

田島 壮一郎 (TAJIMA, Soichiro)