

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS 研究

第1分野

課題番号

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告） 西田基宏 …… 1

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告） 西田基宏 …… 6

KH13302 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発 川端健二 …… 10

第2分野

KH23303 腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究 増田智先 …… 15

KH23304 Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用 中道一生 …… 22

KH23306 吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究 伊澤晴彦 …… 27

KH23307 アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 大喜多 肇 …… 34

KH23331 寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 中野由美子 …… 39

第3分野

KH33308 向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究 橋本亮太 …… 47

KH33309 ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測 小林カオル …… 55

KH33310 薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究 田辺公一 …… 60

KH33332 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究 川上浩司 …… 65

第5分野

KH53312 LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究 伊豫田 淳 …… 69

KH53313 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発 岡田直貴 …… 74

KH53314 PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究 小島伸介 …… 84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究

所 属 京都大学医学部附属病院 薬剤部

研究者 増田 智先

慢性腎不全モデルとして5/6腎摘出ラットを用い、腎病変の進展及び薬物腎挙動の変動について分子機構解明を行う。既に同定している腎不全関連遺伝子群の中から腎機能保全と関わるものの特定と生理機能解明を行う。

A. 研究目的

薬物の尿中排泄は、糸球体濾過に加え近位尿細管における能動的な分泌・再吸収の総和として現れる。近年、腎尿細管の血管側側底膜（薬物の腎移行を媒介）並びに管腔側刷子縁膜（尿細管分泌を媒介）には、それぞれ複数種の薬物トランスポーターが局在し、効率的な解毒機構として機能することが明らかにされてきた。

高齢者を含めた腎機能低下患者では、薬物の腎排泄能の低下から薬剤性腎障害発症のリスクが潜在的に高い。これまで、クレアチニンクリアランスなど糸球体濾過能に着目した薬物使用が行われてきたが、尿細管分泌能の指標となる分子生物学的マーカーの不足から、予期せぬ副作用のために薬物使用の中止を余儀なくされる場合もある。従って、尿細管分泌能の個体間・個体内変動予測を可能とする指標が特定されれば、糸球体濾過能の評価と併せてより安全な薬物使用法の確立に応用できることが期待される

このような背景の下、本研究では慢性腎不全モデルラットを用いて経時的な腎病変の進

展を分子レベルで明らかとし、尿細管トランスポーター群の分子的・機能的変動機構究明と腎機能保護因子の探索・特定を目的とした研究計画を立てた。

B. 研究方法

(1) 慢性腎不全動物の作成

慢性腎不全モデル動物として5/6腎摘出ラットを選択した。7週齢ラットの右腎摘出後、実体顕微鏡下で左腎動脈の分岐部を結紮することによって作成した。なお、模擬処置ラットについては、麻酔下開腹後に、腎動脈を剥離した後に再度腹部を縫合した。なお、給餌、飲水に制限は設けなかった。

5/6腎摘出处置の後、最長24週間飼育したラットを実験に供した。なお、慢性腎不全の確認は、血漿サンプルを用いたクレアチニン値、血中尿素窒素値、グルコース値、アルブミン値や、犠牲死前日からの24時間蓄尿を用いた尿中クレアチニン値、尿中アルブミン値の測定を行った。得られた結果を用いてクレ

アチンクリアランスも求めた。さらに、膀胱尿を回収し、近位尿細管障害の指標として考えられているNアセチルグルコサミニダーゼ(NAG)活性の定量も行った。得られた結果をまとめ、慢性腎不全の病変進展を確認した。

(2) 尿細管分節の単離

模擬処置ラット (Sham) 及び 5/6 腎摘出ラットの左腎を麻酔下で、0.1%コラゲナーゼ含有緩衝液 10mL で灌流後、腎組織を 1mm 厚にスライスし、0.1%コラゲナーゼ及び RNase 阻害剤 vanadate ribonucleoside complex (VRC)含有緩衝液中で 37℃、30 分間インキュベーションした。コラゲナーゼ処理後の腎組織切片は、氷冷緩衝液を用いて洗浄した後、実体顕微鏡下で尿細管分節の形態的特徴に着目し、糸球体、近位尿細管、ヘンレ太い上行脚、遠位曲尿細管、集合管などの分節に単離した。リアルタイム PCR 用のサンプルとして糸球体は 10 個、尿細管は 4mm を用いた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析用のサンプルとしては、糸球体は 50 個、尿細管は 20mm を 1 サンプルとして単離した。

(3) 遺伝子発現解析

単離尿細管サンプルは、グアニジンチオシアネート含有変性剤を用いて、瞬時に溶解し、引き続き total RNA の抽出を行った。リアルタイム PCR 用のサンプルについては、逆転写反応した後一定量の single stranded cDNA を鋳型として用いた。マイクロアレイ解析用のサンプルについては、QIAGEN 社 RNeasy total RNA isolation kit を用いて total RNA を抽出後、T7 配列融合オリゴ dT プライマーを用い逆転写反応を行った。カー

トリッジを用いた cDNA 回収の後に、大腸菌由来 T7 RNA polymerase による mRNA 増幅反応はジゴキシゲニン標識 UTP を用いて行い、濃縮した。最終的に糸球体 50 個、近位尿細管 15mm を試料としてラベル化 RNA フローブは、7~10 μ g 得ることができた。なお、DNA チップを用いた検出は、ABI 社 1700-1 を用いて行った。

(4) 新規トランスポータ様遺伝子のクローニング

我々は既に、Sham ラット及び 5/6 腎摘出 2 週間後のラット残存腎由来の cDNA ライブラリーを用いて、各々から 1,023 クローンをランダムに pick up し、部分塩基配列の解読とデータベース化に基づく代償性腎不全期関連遺伝子群の抽出とクローン化(約 400 の機能未知遺伝子)を終えている。これらの遺伝子群は、腎に高頻度で発現する遺伝子(全 mRNA の 0.1%以上)であることが想定される。約 400 の未知遺伝子の塩基配列を基に、再度 NCBI などのデータベース検索を行い、機能未知遺伝子の同定を行った。SOSUI 等の膜貫通部位予測プログラムを用いて構造が予測された遺伝子がコードするタンパク質の二次構造の推定を行った。次に、薬物トランスポータ蛋白質の特徴として多膜貫通型ということから、膜貫通部位(TM) 8 回以上のものを検索した。抽出されたクローンについて、再度全長塩基配列を解読し、機能解析に使用した。

(5) 倫理面への配慮

動物実験については、京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会に動物実験

計画書を提出し、委員会による審査・承認の上で実施した。また、ヒト臨床検体を用いた解析については、京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会による審査・承認の上で実施した。

C. 研究成果

5/6腎摘出2週後のラット小腸における遺伝子発現解析：腎不全の進展に伴う小腸 PEPT1 の発現亢進について、5/6腎摘出2週目のラットを用いてDNA Chipによる発現解析を行った。その結果、殆どの遺伝子についてはSham群と同程度の発現量を示したが、39種類において2倍以上有意な発現上昇を、151種類で0.5倍以下の有意な発現低下を認め、遠隔臓器である腎臓の病変進展が小腸の遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなった (Fig. 1)。また、有意な発現変化を示した遺伝子の内、約半数は機能未知であった。さらに、得られたデータを中心に Pathway 解析を行ったところ、一部 PEPT1 のタンパク質分解速度の制御に関連する遺伝子が抽出された。

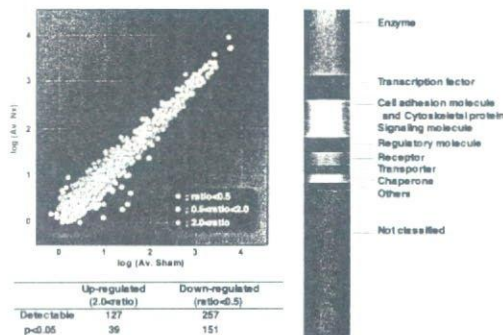


Fig. 1. 十二指腸mRNA発現プロファイルの慢性腎不全による影響

慢性腎不全の進展に伴う遺伝子発現変化：Shamラット、5/6腎摘出1、2、4、8週間のラット残存腎由来近位尿細管を試料として

Gene Chip解析を行った結果、約27,000遺伝子の内Shamで約12,000種、5/6腎摘出ラットで平均10,000種検出された。さらに、5/6腎摘出24週目において100倍以上の発現上昇が95種、一方、1/100以下に低下するものとして82種の遺伝子が抽出され、経時変化も考慮に入れるとFig.2Aに示すように多様なクラスターに分類しうることが明らかとなった。また、代表的な発現変動を示すクラスターに注目すると、腎病変の進展に伴い発現上昇または低下し続けるものと腎病変の状態それぞれに対して特徴的な変化を示すものが見出された (Fig. 2B)。特に尿細管トランスポータ群の多くは、腎病変と共に発現量が低下し続けるクラスターに属しており、病理学的に尿細管病変が軽度であっても薬物の尿細管分泌能に低下が見られるこれまでの現象と一致した。なお、腎症の進展に伴い発現亢進することが知られている炎症性サイトカインの発現変化は認められなかった。

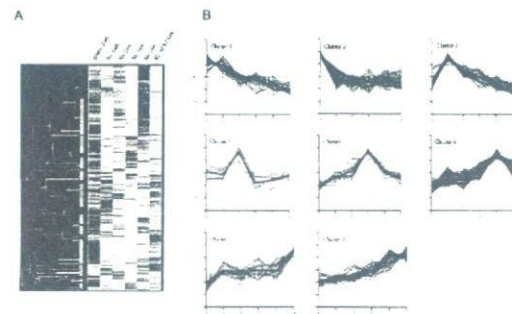


Fig. 2. 5/6腎摘出ラット腎における遺伝子発現変化

新規トランスポータのクローニング：これまでA及びBと符号化した2種類のトランスポータ様遺伝子の単離に成功した。RACE法によって全長cDNAを単離、他の生物種における塩基配列データベースも調べた結

果、機能未知であるもののクローン A は生物種を超えて広く保存されていること、クローン B も主要なほ乳類において高く保存されていることが判明した。また、RT-PCR 並びに RACE 法によって、ヒト型、マウス型カウンターパート遺伝子の単離も行った。特に、クローン B については少なくとも 3 種類のスプライシングバリエーションの存在すること、我々の単離したクローン以外はフレームシフトによるアミノ酸配列の不完全なタンパク質合成につながることを判明した。次に、クローン B について発現臓器を調べた結果、各スプライシングバリエーション特異的な PCR 条件下において、我々の単離した遺伝子は、腎臓に強く発現することが認められた。一方、機能を保持していないと考えられるバリエーション mRNA は広く分布することがわかった。基質輸送活性について調べた結果、何れの遺伝子についても市販の放射性標識化合物約 30 種類の膜輸送には関与していないことが示された。一方、クローン B を発現させた HEK293 細胞では、一部の生体必須化合物の取り込み速度の上昇が認められ、特異的な siRNA を用いたところ本化合物の取り込み量は著しく低下した。

尿細管特異的なシスプラチン腎症の確立：腎毒性が臨床使用上問題となる白金系抗腫瘍薬シスプラチンは、無機化合物であるが塩基性電化も有する。我々は、この物理化学的特徴に着目し、シスプラチンによる腎毒性起点因子として有機カチオントランスポーターに焦点を当てた。その結果、シスプラチンは近位尿

細管特異的に発現するラット有機カチオントランスポーター rOCT2 (Slc22a2) に強く輸送されること、肝臓型である rOCT1 (Slc22a1) による輸送は弱いことを見出した。また、低用量のシスプラチン背部皮下投与は、BUN、クレアチニン、尿中アルブミンなどの糸球体機能マーカーには影響せず、尿中 NAG の顕著な上昇を引き起こし、その毒性は近位尿細管特異的に発症することが示唆された。さらに、ラット腎において rOCT2 は雄性ホルモンテストステロンによる誘導を受けることを利用して、去勢ラットを作成したところ、腎 rOCT2 の発現低下と対応してシスプラチン (2mg/kg) 投与による腎障害は認められないことが判明した。

D. 考察

慢性腎不全ラットを用いた遺伝子発現解析：我々は、5/6 腎摘出によりジペプチド、ペプチド類似薬物の小腸における吸収速度が亢進すること、この現象には小腸 PEPT1 タンパク質の発現上昇が深く関わっていることが見出された。次に、この現象を分子レベルで明らかにするために DNA Chip 解析を行ったところ、遠隔臓器でありながら腎不全による影響は、小腸にも認められること、190 種類の遺伝子発現に影響を及ぼすことが判明した。さらに、Pathway 解析を行ったところ一部膜タンパク質の安定性に関わる遺伝子の有意な変化が見出された。今後、培養細胞を用いて PEPT1 との関連について精査する予定である。

これまでの whole kidney を用いた遺伝子発現解析の結果から、PDGF や TGF β が腎症にお

いて一般的に発現亢進しており、その病変進行と関連するということが考えられてきた。一方、本研究において単離近位尿細管を用いた検討から、炎症性サイトカインとその間連遺伝子の発現上昇は全く認められなかった。従って、従来のデータは浸潤リンパ球由来の遺伝子産物であることが推察された。また、純度の高い試料を用いることにより、これまで他の細胞由来の大きく変動する遺伝子によって見落とした可能性のある近位尿細管特異的に発現変化する遺伝子群を本研究により見出すことが可能になると期待される。さらに、クラスター解析の結果、腎病変そのものに反応し画一的に発現上昇/低下する遺伝子や、その状態（経時）特異的に発現変化する遺伝子の存在が見出された。今後、個々の遺伝子について詳細な発現解析を行うことにより、腎病変進展の遺伝子マーカーの抽出を進める予定である。

新規トランスポータ様遺伝子のクローニング；本研究において同定した2個のトランスポータ様遺伝子は、既に構築している腎cDNA発現データベースから単離したものであり、全遺伝子中0.1%程度の発現量が期待できることから、腎において高発現が期待できる。一方、他の発現臓器を調べた結果、ほぼ全ての細胞に存在すること、何れの遺伝子も生物種を超えて高く保存されていることから、細胞の生命維持または増殖に密接に関わることが推察される。さらに、クローンBについては、一部の生体必須化合物を認識することが強く示唆された。これまで、本化合物を輸送するトランスポータは未知であることから、

極めて重要な発見に繋がることが期待される。現在、特異抗体による膜局在などの検討を進め、さらに機能解析を追加し、特許化も考慮にいれながら論文投稿の準備段階にある。

シスプラチン腎症の分子機序解明と尿細管特異的なシスプラチン腎症の確立；本研究において、シスプラチンを輸送するトランスポータを世界で初めて特定することができた。さらに、rOCT2がシスプラチンの腎移行過程、すなわち細胞毒性のtrigger蛋白として機能することが示唆された。現在臨床で使用されている腎毒性を軽減した白金系抗腫瘍薬（カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン）は、細胞内においてすべてシスプラチンと同様の化学構造に変化した後に細胞毒性を発揮することが知られている。従って、これら新世代の白金系抗腫瘍薬は、OCT2の基質とならないことから腎毒性が弱いことが推察される。また、本研究で使用した微量の投与量は、糸球体への影響が殆ど無く、近位尿細管に対して強く障害を引き起こすことから、本モデルラットが今後尿細管障害モデルとして使用可能だけでなく、近位尿細管は糸球体よりも障害を受けやすいこと、すなわち従来のクレアチンクリアランスを指標とした腎機能の評価では、潜在的な尿細管障害の鋭敏な検出に不十分なことが薬剤性腎障害という側面から示唆された。今後、本モデルラットにおいても精密な遺伝子発現解析を実施し、慢性腎不全における遺伝子発現変化と比較することによってより特異的なマーカー遺伝子の特定に繋がることが期待される。

E. 結論

5/6 腎摘出ラットを用いた遺伝子発現解析を着実に進め、候補遺伝子の絞込を行った。また、rOCT2 は 5/6 腎摘出処置後速やかに発現低下することから、塩基性薬物の腎移行速度の低下が示唆される。特にシスプラチンを輸送する腎トランスポータとして rOCT2 を特定することができたことは、今後の病変の比較によるより特異性の高い遺伝子マーカーの特定に繋がることが期待される。

F. 成果発表

1. 論文発表

- 1) Terada T, Masuda S, Asaka J, Tsuda M, Katsura T, Inui K, Molecular Cloning, Functional Characterization and Tissue Distribution of Rat H⁺/Organic Cation Antiporter MATE1, *Pharm Res* **in press**
- 2) Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y and Inui K, Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 16:119-127 (2006)
- 3) Masuda S, Goto M, Fukatsu S, Uesugi M, Ogura Y, Oike F, Kiuchi T, Takada Y, Tanaka K and Inui K, Intestinal MDRI/ABCB1 level at surgery as a risk factor of acute cellular rejection in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 79:90-102 (2006).
- 4) Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K, Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol* 70:1823-1831 (2005).
- 5) Sakurai Y, Motohashi H, Ogasawara K, Terada T, Masuda S, Katsura T, Mori N, Matsuura M, Doi T, Fukatsu A and Inui K, Pharmacokinetic significance of renal OAT3 (SLC22A8) for anionic drug elimination in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Pharm Res* 22:2016-2022 (2005).
- 6) Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T and Inui K, Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:379-386 (2005).
- 7) Urakami Y, Kimura N, Okuda M, Masuda S, Katsura T and Inui K (2005) Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line LLC-PK1. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:200-205 (2005).
- 8) Shimizu, Y., Masuda S, Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M., and Inui, K., Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺/peptide cotransporter up-regulates absorption of glycylsarcosine and cefibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* 288(4):G664-G670 (2005)
- 9) Omae, T., Goto, M., Shimomura, M., Masuda S, Okuda, M., and Inui, K., Transient

up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion injury in rat ileum. *Biochem Pharmacol* **69** (4) 560-567 (2005)

- 10) Fukudo, M., Yano, I., Masuda, S., Okuda, M., and Inui, K., Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin A on calcineurin phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther* **312** (2) 816-825 (2005)

2. 学会発表

1) 国際学会

- (1) Yonezawa A, Masuda S., Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K, Role of rOCT2 in cisplatin-induced nephrotoxicity, BioMedical Transporters 2005 (8月14-18日、Olma Congress Center, St. Gallen, Switzerland)

2) 国内学会

- (1) 本橋秀之、櫻井裕治、増田智先、寺田智祐、桂敏也、深津敦司、土井俊夫、乾賢、原発性糸球体障害患者におけるOAT3 (SLC22A8)発現量はセファゾリン腎排泄速度を規定する、第48回日本腎臓学会学術総会(6月23-25日、横浜市、パシフィコ横浜)
- (2) 米澤 淳、増田智先、西原久美子、矢野育子、桂敏也、乾賢一、Nephrotoxicity of cisplatin focusing on rOCT2 (Slc22a2)、第48回日本腎臓学会学術総会(6月23-25日、横浜市、パシフィコ横浜)

- (3) 木村尚子、谷原悠子、増田智先、乾賢、経口血糖降下薬メトホルミンの腎移行、医療薬学フォーラム2005(7月16-17日、鹿児島県、鹿児島市民文化ホール)

- (4) 谷原悠子、木村尚子、増田智先、桂敏也、乾賢一、腎有機カチオントランスポータOCT2の基質認識特性、第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(一般口演)(平成17年11月28-29日、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」)

- (5) 米澤 淳、増田智先、西原久美子、矢野育子、桂敏也、乾賢一、シスプラチン誘発腎毒性の規定因子としての有機カチオントランスポータOCT2 (Slc22a2) 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(一般口演)(平成17年11月28-29日、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」)

- (6) 西原久美子、増田智先、米澤 淳、桂敏也、乾賢一、腎不全状態が及ぼす小腸の機能変動に関する因子の探索、日本薬学会第126年会(3月28-30日、仙台市、仙台国際センター外)

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
2) 実用新案登録 なし
3) その他 なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社