

200809003A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業  
(創薬バイオマーカー探索研究)

薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーの探索と  
臨床的重要性の解明に関する研究

(課題番号 H20-バイオ-一般-002)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 増田 智先  
研究分担者 深津 淳司

平成21年(2009年)3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業  
(創薬バイオマーカー探索研究)

# 薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーの探索と 臨床的重要性の解明に関する研究

(課題番号 H20-バイオ-一般-002)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 増田 智先  
研究分担者 深津 淳司

平成21年(2009年)3月

## 目 次

I. 総括研究報告書		
薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーの探索と 臨床的重要性の解明に関する研究 研究代表者 増田智先	-----	1
II. 分担研究報告書		
腎組織標本の損傷スコア解析とヒト腎生検 組織標本の収集 分担研究者 深津敦司	-----	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	35

薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーの探索と臨床的重要性の解明に関する研究

研究代表者 増田 智先 京都大学医学部附属病院薬剤部・講師

研究協力者 乾 賢一 京都大学医学部附属病院薬剤部・教授

研究協力者 Joseph V. Bonventre 米国ハーバード大学医学部・  
Brigham and Women's Hospital 腎臓部門・教授

研究要旨

ラット単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析によって、慢性腎不全進展に関連する重要遺伝子の同定に成功した。特に、末期腎不全期においては、mTOR 阻害薬が近位尿細管の保護効果を有することを見いだした。パンコマイシン及びシスプラチン腎症モデルラット尿を用いたメタボローム解析及びプロテオーム解析から、個々の薬物による腎症を反映しうる分子の特定を行い、低分子化合物についてはLC-MS/MS法による同時測定系を確立した。さらに、ヒト腎生検組織を用いたマイクロアレイ解析系の確立を行うと同時に、ヒト尿検体を用いた網羅的なELISA系の実施によって、一部炎症性タンパク質の尿中への漏出が近位尿細管上皮細胞の障害と対応すること、このタンパク質は軽度シスプラチン腎症モデルラットを用いたマイクロアレイ解析でも発現亢進することが見いだされ、新しい尿中バイオマーカーとして期待されることが強く示唆された。

研究分担者

深津 敦司 京都大学医学部附属病院  
講師・腎臓内科長

A. 研究目的

集中治療室(ICU)における急性腎不全のうち20%は薬剤に起因しその50-80%が死に至る。このため、腎障害を誘発・増悪させる潜在的要因を持つ患者への様々な薬物(造影剤、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬)の使

用には、腎機能(尿細管薬物輸送能)を正確に把握した上で患者個々に応じた薬物投与設計に加え、薬剤性腎障害の速やかな発見と適切な対応が望まれている。

近年、Acute Renal Failure (ARF)はAcute Kidney Injury (AKI)として再考されている。AKIは、直近48時間以内における血清クレアチニンや尿量の変化を指標に全3期に分類され、第III期では持続性血液透析療法など腎代替療法の速やかな導入が推奨されている。一方、AKI発症か

ら血清クレアチニン値上昇に要する時間には個体差が大きく、より迅速かつ的確に AKI を診断するためのバイオマーカーの特定と臨床応用が喫緊の解決課題とされている。

我々はこれまで、ヒト腎組織を用いたトランスポータ発現レベルの網羅的解析を通じて、有機アニオントランスポータ OAT3/SLC22A8 が  $\beta$ -ラクタム抗生物質セファゾリンの尿中排泄速度と対応することを見出した。また、小腸の MDR1/ABCB1 発現レベルが生体肝移植直後の免疫抑制剤タクロリムスの初期用量設定因子/術後の拒絶反応危険因子であることを突き止めた。最近では、米国ハーバード大・Brigham and Women's Hospital 腎臓部門において、AKI バイオマーカーである KIM-1 の生理機能の一端を解明した。

本研究では、これらの経験と実績を踏まえて、ヒト尿検体、腎生検組織を用いたプロテオミクス、トランスクリプトーム、病理解析を並行して、より迅速かつ的確な薬剤性腎障害の非侵襲性マーカー探索とその臨床的重要性を解明するという計画を立案した。研究計画初年度である平成 20 年度では、(1) ラット薬剤性 AKI モデル尿を用いたプロテオーム、トランスクリプトーム及びメタボローム解析を進め、尿中バイオマーカー候補分子の探索を行った。(2) 慢性腎不全モデルラット腎より単離した近位尿細管を用いたトランスクリプトーム解析を行い、薬

物を使用しない場合における腎不全進展のバイオマーカー探索とそれを標的とした病変進展の治療効果について検討を進めた。(3) ヒト腎生検組織を用いた尿中プロテオーム解析並びにトランスクリプトーム解析を行い、微量組織検体を用いた解析系の確立を行った。

## B. 研究方法

(1) ラット薬剤性腎障害モデルの作製とメタボローム、プロテオーム解析

### ・虚血再灌流モデルラットの作成

7週齢の Wistar/ST 雄性ラットの両腎を 5、15、30 分虚血後、開放し膀胱尿をタンパク質分解阻害剤入りのチューブに氷冷下で回収した (開放後 60 分間)。尿サンプルはクレアチニン濃度 (10 mg/dL) で補正し、凍結保存とした。血漿サンプルは凍結保存し、病理標本作成用組織サンプルはカルノイ液による固定の後 PAS 染色に供した。

### ・薬剤性腎障害モデルラットの作製

7週齢の Wistar/ST 雄性ラットにバンコマイシン (VCM) 40mg/kg または 400 mg/kg を尾静脈より投与した。対照として乳酸リンゲル液を投与した。また、シスプラチン (CDDP) 5 mg/kg を腹腔内より投与した。薬物投与後 2 日目に、麻酔下にて膀胱尿を採取した (60 分間、氷冷)。尿サンプルはクレアチニン濃度 (10 mg/dL) で補正し、凍結保存とした。同時に、虚血再灌流モデルラットと同様に、血漿サンプル、病理標本作成用組織サンプルを

回収した。

・尿サンプルを用いたメタボローム解析  
各モデルラットについてそれぞれ 5-6 例作製し、血漿生化学データを指標に抽出した 3 例分を 1 群としてプール、コントロール群、虚血再灌流 (5、15、30 分) 群、VCM 腎症 (40mg/kg、400mg/kg)、CDDP (5mg/kg) の計 7 群として、ウオーターズ社 LC-TOF MS (ジナリス社に委託) によるメタボローム解析を行った。LC-TOF MS による解析の結果、約 2200 の化合物が見いだされたが、構造が明らかでない既知化合物は 800 種程度であった。その中から、重金属ではない、値の変化が大き、化合物情報がある、Log P 値が小さい、という 4 つの条件を満たす化合物を抽出し、rare chemical として入手可能な化合物を選別した。

・尿サンプルを用いたプロテオーム解析  
メタボローム解析用にプールした尿サンプルの一部を de novo sequencing (MS/MS スペクトルを解析しアミノ酸配列を決定する方法、Applied Biosystems 社) により解析 (フィルジェン社に委託)。解析は、コントロール、虚血再灌流 (15 分)、VCM (400mg/kg) 及び CDDP (5mg/kg) の 4 群とした。

(2) 慢性腎不全モデルラットの作製と近位尿細管の単離、並びにバイオマーカーの探索

・慢性腎不全モデルラットの作製  
慢性腎不全モデル動物として腎亜全摘 (5/6 腎摘出) ラットを選択した。

Wistar/ST 系雄性ラット (7 週齢) の右腎を摘出し、実体顕微鏡下で左腎動脈分岐部を結紮することによりモデル動物を作製した。腎摘出後 1、2、4、8 週間飼育し、後の実験に供した。各時点における各種生化学的検査値 (血漿クレアチニン値、クレアチニンクリアランス、血中尿素窒素値、尿中アルブミン値) および PAS 染色による病理組織像により病態の進展を確認した。

・腎近位尿細管分節の単離  
コントロールラット (模擬処置 2 週間後) および 5/6 腎摘出ラット (腎摘出処置 1、2、4、8 週間後) の残存腎を 0.1% コラゲナーゼ含有緩衝液で灌流後、腎組織を 1mm 厚にスライスし、飽和 O<sub>2</sub> 下にて 0.1% コラゲナーゼおよび RNase 阻害剤 vanadate ribonucleoside complex (VRC) 含有緩衝液中で 37°C、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から、冷却緩衝液中、実体顕微鏡下において尿細管分節の形態学的特徴に着目して近位尿細管を単離した。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、一頭あたり 20mm の近位尿細管を採取した。

・トランスクリプトーム解析  
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、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA からアプライドバイオシステムズ社の RNA 増幅・標識キットを用

いて、ジゴキシゲニン標識 cRNA を作成した。標識した cRNA (10 µg) を断片化した後、Rat Genome Survey Microarray (アプライドバイオシステムズ社) にハイブリダイズ (55°C、16 時間) させ、AB1700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて化学発光系シグナルの検出を行った。数値解析および遺伝子機能・パスウェイ解析にはそれぞれ Spotfire® および MetaCore™ を用いた。

(3) In situ ハイブリダイゼーション  
腎摘出处置 2 週間後に残存腎組織を灌流固定した後、パラフィンで包埋した。6 µm に薄切した切片をジゴキシゲニン標識したセンスプローブおよびアンチセンスプローブとハイブリダイズさせ、アルカリフォスファターゼ標識-抗ジゴキシゲニン抗体および発色基質として NBT/BCIP を用いて腎臓における mRNA 発現分布および 5/6 腎摘出处置による発現変化を確認した (ジェノスタッフ社に委託)。

(4) 新たに見いだした腎不全進展マーカー分子を標的とした薬物治療効果の検討

#### ・低分子化合物

低分子化合物については、標品が入手可能なものについて保有している LC-MS/MS システム (API4000 質量分析機、アプライドシステムズ) を用いて測定系の構築を行った。

#### ・タンパク質

尿中タンパク質については、各種 ELISA

キットまたは BioPlex サスペンションベースアレイシステムを用いた同時多項目測定法 (17 項目同時定量) を用いて調べた。

(5) ヒト腎生検組織及び尿検体の採取とそれを用いたトランスクリプトーム解析並びにプロテオーム解析

#### ・ヒト腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析

ヒト腎生検組織は、常法に従って腎皮質部の組織を穿刺・採取して得られたものから、診断に支障のない部分 (0.5mm 角程度) を RNA 安定化剤 (RNA Later、アンピオン社) 入りのクライオチューブに入れて固定した。固定化した腎生検組織から RNeasy Micro kit (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した後、アジレント社の RNA 増幅・標識キットを用いて Cy-3 標識 cRNA を作成した。RNA 増幅・標識反応時には、増幅反応の線形性、アレイへのハイブリダイズの正確性および感度の確認を行なうため RNA Spike In-Mix (アジレント社) を加えた。

#### ・ヒト腎生検由来 total RNA のクオリティチェック

得られた total RNA は、アジレント社 2100 バイオアナライザを用いてリボソーム RNA 比率および RNA Integrity Number (RIN) により品質確認を行なった。また、蛍光標識 cRNA は収量および Cy-3 取り込み率を算出した。(収量 1.65 µg 以上、Cy-3 取り込み率 9 pmol/µL 以上を必要とする)

#### ・マイクロアレイ

蛍光標識した cRNA (1 $\mu$ g) を断片化した後、Whole Human Genome アレイ (アジレント社) にハイブリダイズ (65°C、17 時間) させ、蛍光シグナルを Agilent DNA マイクロアレイスキャナにより高分解能画像として抽出した。Feature Extraction ソフトウェアを用いて、各スポットの数値化、バックグラウンド補正および疑いのあるデータの抽出を行い数値解析に供した。同時に QC レポートを作成しアレイ処理のモニターを行なった。

#### (5) 倫理面への配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言 (1975 年、東京総会で修正) を尊重し計画されたものであり、対象患者個人の人権擁護を最優先する。すなわち、自由意志による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、同意した場合でも随時撤回できそれによる不利益を受けないこと、血液や組織由来の核酸が他の目的で使用されないこと、実施対象者の個人識別情報は連結不可能匿名化方式で厳重に管理保護されていること、遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては個人が特定できない方法でのみ行うこと、を遵守している。なお、本研究計画は、「腎疾患患者における薬物輸送体の発現量並びに遺伝子多型に関する臨床研究」

(G-159、代表者 京都大学医学部附属病院教授・薬剤部長 乾 賢一、申請代表者 増田智先及び分担研究者 深津敦司は分

担研究者として参画している) という題目で、京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会に審査を受け、研究科長より承認書が交付されており (平成 17 年 7 月 6 日付け)、平成 17 年 6 月 29 日に改正された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省) を遵守するものである。

#### (6) 安全対策に対する対応

本研究では、組み換え遺伝子を研究資源として用いることから、その排除レベルは P (物理レベル) 2・B (生物レベル) 1 である。その際、自然界にこれら人工的な遺伝子の影響が及ばないように、廃棄の際には全て高圧蒸気による 121°C、30 分間のオートクレーブ処理を行うこととした。なお、本研究計画に関わる遺伝子組み換え実験については、既に京都大学宛に計画調書を提出するとともに許可申請を得ている(「遺伝子改変動物を用いた薬物動態・薬効関連因子群の評価に関する研究」増田智先、No.070661、平成 20 年 5 月 16 日付)。

#### C. 研究結果

(1) 薬剤性急性腎障害モデルラット尿を用いたバイオマーカー候補分子の探索

AKI の発症に伴う尿中への様々な分子の漏出は、進行性の腎症をキャッチし、迅速な対症療法を可能とする。特に、薬剤性の AKI では、患者の容態にも影響を受けるが、しばしば致死的な腎不全へと悪化する場合は認められる。今年度では、



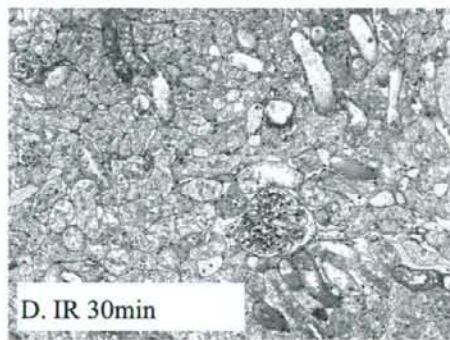
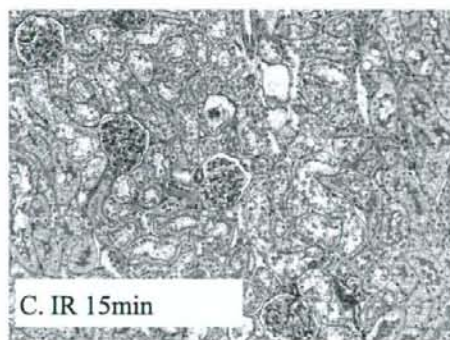
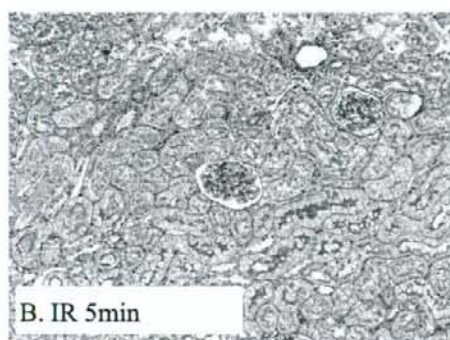
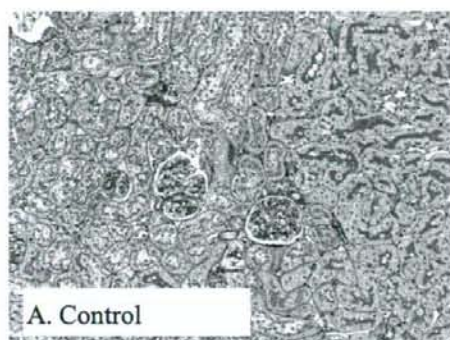
入院患者において頻度が比較的高く認められる薬剤性 AKI としてシスプラチンとバンコマイシンを対象薬物として検討を進めた。

まず非薬剤性 AKI のモデルとして虚血再灌流障害 (IR、5 分、15 分、30 分) を対照として選択し、正常ラットに対してシスプラチン (CDDP、5mg/kg、腹腔内投与) またはバンコマイシン (VCM、40mg/kg、400mg/kg を尾静脈内投与) 処置の後 2 日目にサンプル回収を行った。Table 1 に示すように、IR 5 分、15 分、VCM 40mg/kg、CDDP 5mg/kg を処置されたラットの血清生化学データは特に重症度を示さない。同様に、尿中クレアチニンやアルブミン濃度も変化は認められるものの、重篤とまでは考えられないが、特に CDDP 処置の場合、経日的に腎機能は悪化することから、早期段階における

Table 1. メタボローム解析、プロテオーム解析に用いたラットの生化学的検査データ

	Ser	BUN	Ucr	Ualb	NAG
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/day	IU/dL
Control	0.63±0.04	17.9±2.3	47.3±9.8	1.6±0.1	15.0±1.2
IR 5min	0.59±0.02	19.0±1.0	51.3±5.9	13.1±3.4	46.7±8.5
IR 15min	0.87±0.11	25.0±4.7	22.3±2.9	32.3±3.4	139±41
IR 30min	0.73±0.06	22.4±0.5	20.1±4.5	38.8±0.3	200±34
VCM 40mg/kg	0.56±0.03	13.7±1.4	62.0±4.9	5.1±0.8	22.6±2.4
VCM 400mg/kg	0.56±0.04	17.5±4.3	84.0±11.5	6.0±1.2	46.7±7.6
CDDP 5mg/kg	0.76±0.06	22.1±2.9	86.3±8.9	7.8±1.3	40.0±6.3

Ser, serum creatinine; BUN, blood urea nitrogen; Ucr, urinary creatinine; Ualb, urinary albumin; NAG, N-acetyl-beta glucosaminidase



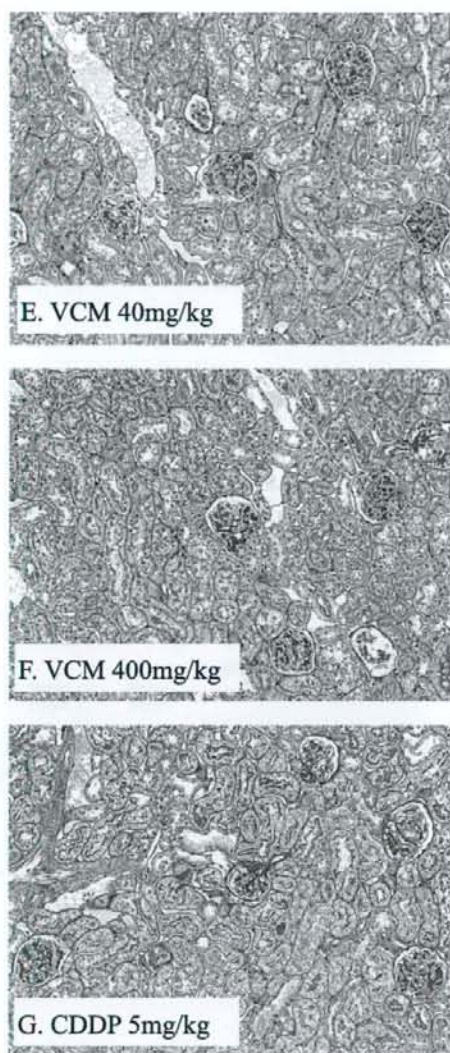


Fig. 1. 虚血再灌流 (IR)、バンコマイシン (VCM) またはシスプラチン (CDDP) 投与により作製した AKI モデルラットの腎組織像 (PAS 染色). 特に、近位尿管の管腔側刷子縁膜の脱落、上皮細胞の空洞化・変性がより強い処置によって顕著になる。

AKIの検出が臨床においても重要と考えられる。これらの想定の下、本研究では比較的軽度な (臨床用量に準ずる) AKI ラット尿を用いバイオマーカー分子の探

索を行った。Fig 1 には、検討に用いたラット腎組織を PAS 染色した結果を示す。

#### ・メタボローム解析

Fig. 2. に示すように LC-TOF MS による解析の結果、生化学的パラメータ上ではほぼ同程度の AKI が発症していたにもかかわらず、尿に見いだされる化合物のパターンは大きく異なることが示された。得られた 2200 程度のシグナルから、

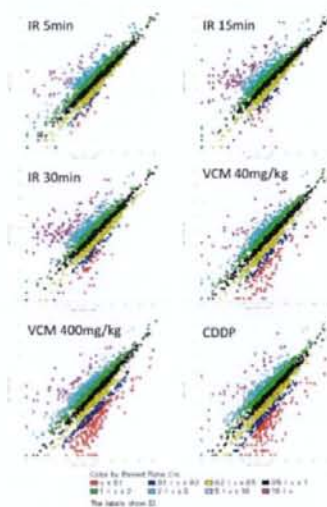


Fig. 2. メタボローム解析結果の散布図。処置によって、パターンが異なることが示された。

方法に示した 4 つの条件を満たすもの 800 種程度に絞り、化合物の構造が絞り込めるものかつ標品が入手可能なものを選別した結果、5 種類の低分子化合物を選別するに至った (Fig. 3)。

次に、これら 5 化合物の中で標品が入手できたものから LC-MS/MS 法による測定系の構築を進めた。

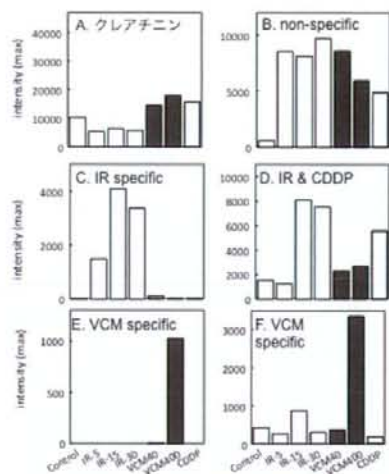


Fig. 3. メタボローム解析によって見いだされた尿中低分子化合物バイオマーカー候補。尿中クレアチニン濃度を同程度に調節した後に解析を行ったため、クレアチニン濃度はほぼ同程度。

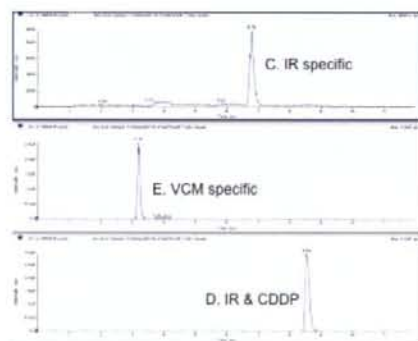


Fig. 4. メタボローム解析によって見いだされた尿中低分子化合物バイオマーカー候補の測定系構築。図中の記号等はFig. 3.に対応する。従って、Fig. 3.のIR specific (C)、IR及びCDDP感受性 (D) 及びVCM specific (E) に尿中へと漏出する低分子化合物の同時測定系の構築に成功した。

### ・プロテオーム解析

メタボローム解析で用いた尿の余剰分を de novo sequencing 解析に用いた。156種類のペプチド断片が検出され、コントロール尿と比べて 2.5 倍以上の上昇とい

う条件を設定し、データベースとの比較解析の結果、IR で 7 種、VCM のみで 1 種、CDDP のみで 1 種のタンパク質が見いだされた。一部を Fig. 5. に示す。その結果、IR 15 分、VCM 400mg/kg、VCM 400mg/kg 及び CDDP 5mg/kg 投与によって尿中に漏出されるタンパク質の検出に成功した。

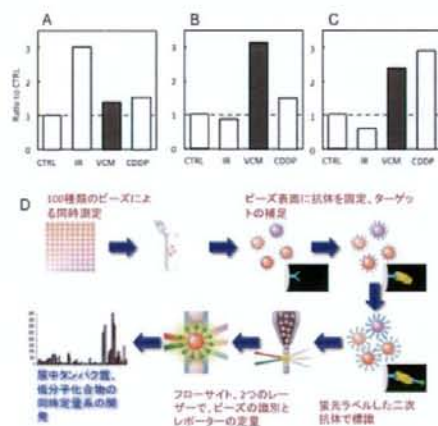


Fig. 5. プロテオーム解析によって見いだされた尿中バイオマーカー候補タンパク質。(A) IR 15min specific、(B) VCM 400mg/kg specific、(C) 薬剤性AKI感受性 (すべてコントロールに比べて2.5倍以上上昇)。(D) サスペンションビーズアレイの測定原理。

### (2) 慢性腎不全モデルラットを用いた腎病変進展に関わるバイオマーカーの探索と分子メカニズムの解明

腎臓の近位尿細管には異物解毒を担う薬物トランスポーターが複数存在しており、能動的な薬物の尿細管分泌を媒介している。さらに、心拍量の 25% が流れ込む腎臓は高濃度の薬物にさらされることが想定される。従って、血中濃度に比較し

て高濃度に蓄積した薬物による細胞毒性は、近位尿細管で特に危険性が高いと考えられる。一方、これまでの研究で得られた情報では、高用量の薬物による腎毒性の結果、重篤な末期腎不全状態における結果など臨床における「腎機能低下患者における常用量の薬物による腎障害」を正確に反映し得ない。そこで、腎垂全摘モデルラット（5/6 腎摘出ラット）を作製し、薬物を使用しない条件における慢性腎不全の進展過程における近位尿細管遺伝子発現の変化を調べ、薬物負荷による変化の基礎データとすることとした。また、ヒトと同様に、5/6 腎摘出ラットでは、術後早期における代償性腎不全期を呈する。すなわち、残存腎による代償反応によって、単位ネフロンあたりの糸球体濾過速度が亢進し、見かけ上機能維持、多尿等の症状を呈する。臨床で見られる腎機能低下患者における薬剤性腎障害の多くは代償性腎不全期において散見されるため、代償性腎不全期の進展過程における重要な分子メカニズムの解明についても検討を進めた。

#### ・単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析の有用性

Fig. 6. に示すように、実体顕微鏡下单離した近位尿細管（20mm）における遺伝子発現プロファイルは、他の細胞や小器官由来の遺伝子発現データを最小限にすることができ、他の細胞由来の遺伝子発現に左右されない解析法と考えられた。特に、近位尿細管に豊富に発現する薬物

トランスポータ、栄養物質トランスポータ遺伝子の発現パターンは、whole kidney を試料とした場合に比べて上に凸であること、血球細胞由来と考えられる遺伝子シグナルは下に凸であった。これまで、AKI や慢性腎不全において腎繊維化における重要遺伝子とされてきた TGF-beta は、近位尿細管を用いた解析では検出されず、混入した血球由来のものであることが強く示唆された。

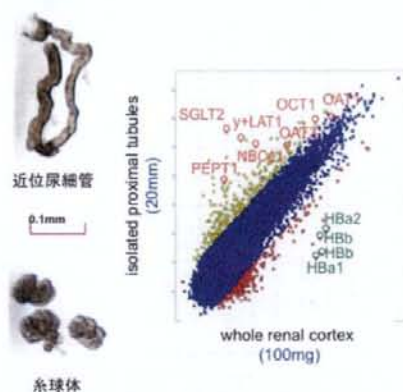


Fig. 6. ラット単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析。近位尿細管20mmで得られるシグナルは、whole kidneyと比べてより強く、また混入血球細胞由来と考えられる遺伝子のシグナルは弱い。すなわち、近位尿細管におけるイベントに焦点を当てることのできる手法であると考えられる。

#### ・慢性腎不全の進展過程における遺伝子発現プロファイル

単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析の有用性が確認されたことから、薬物を使用しないモデルとして 5/6 腎摘出ラットを選択し、慢性腎不全の進展過程における遺伝子発現プロファイルを調べ、代償性腎不全期における重要反応経路の探索を行った。

Fig. 7.には、5/6腎摘出ラットにおける術後経過に応じた腎病変進展について、病理学的及び生化学的側面からまとめている。急激なネフロン数の減少によって、残存ネフロンに対する負荷が増大し、単位ネフロンあたりの糸球体濾過速度上昇に伴って、糸球体や尿細管の拡張が観察される。

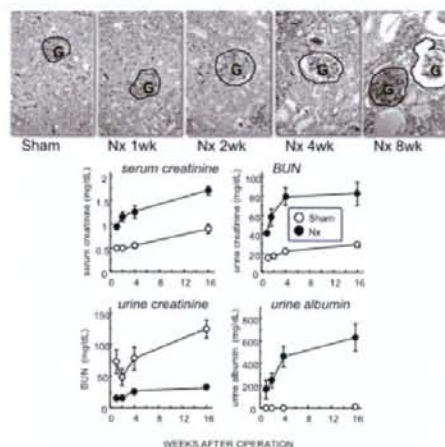


Fig. 7. 5/6腎摘出 (Nx) ラットの経目的な病変進展。2週目までは、糸球体や尿細管の肥大が見られるが、8週目ではリンパ球・マクロファージの浸潤や間質の繊維化が著明に認められる。図中Gは糸球体を示す。

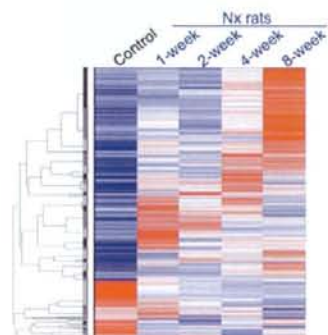


Fig. 8. 5/6腎摘出 (Nx) ラット単離近位尿細管における遺伝子発現プロファイルの経目的な変化。

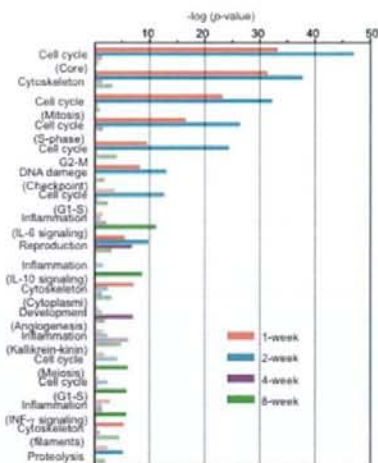


Fig. 9. 5/6腎摘出 (Nx) ラット単離近位尿細管における遺伝子発現プロファイルの経目的な変化: Gene ontology解析。

各群 4 例を用いて近位尿細管を単離し、total RNA 抽出、ラベル化を行い、マイクロアレイ解析を行った (Fig. 8)。得られた結果について Gene ontology を調べたところ Fig. 9 に示すように、術後早期の代償性腎不全期では細胞増殖に関連する遺伝子群の発現亢進が明らかとなった。これらの解析から、細胞増殖に関連する遺伝子 (便宜上 G、H とする) が抽出された。いずれも代償性腎不全期 (術後 2 週目) を発現のピークとして以降減少傾向を示した。従って、本遺伝子は残存腎においてネフロン数の急激な減少に対応するための組織再生に関わるメカニズムとして位置づけられると仮説を立てた。すなわち、腎機能低下時における両遺伝子発現の検出は、回復の可能性を推し量ることができることから、透析導入のための判断材料となることが期待される。

これらを念頭に、マイクロアレイデータの検証、ラット *in vivo* における細胞増殖阻害薬投与の本遺伝子発現への影響について検討を進めた。

まず、リアルタイム PCR による mRNA 発現について調べたところ、マイクロアレイで得られたデータと対応して、5/6 腎摘出 1~2 週目で高い発現を示すことが判明した。同時に、*in situ* ハイブリダイゼーションによる腎内 mRNA 局在を調べたところ、近位尿細管特異的に発現することが明らかとなった (Fig. 10)。

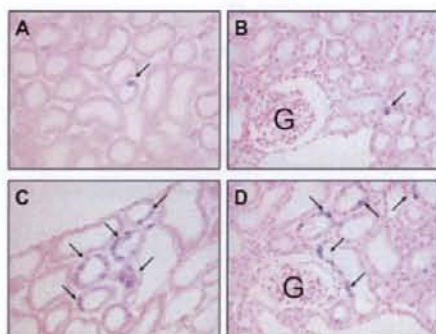


Fig. 10. 5/6腎摘出 (Nx) ラットにおける遺伝子 G、H の mRNA 発現。A、B: Sham 処置ラット、C、D: 5/6腎摘出2週目のラット。A、C: 遺伝子G; B、D: 遺伝子H。図中Gは糸球体を示す。

さらに、特異抗体を用いた検討の結果、代償性腎不全期におけるこれら2種のタンパク質発現は近位尿細管に局限することが確認された。

次に、これら遺伝子が細胞増殖に関連することから 5/6 腎摘出直後より細胞増殖阻害薬を皮下に 14 日間投与した。その

結果、Fig. 11 に示すように残存腎の肥大は抑制され (Fig. 11A, B)、代償的に過剰濾過となっていた単位糸球体あたりの濾過量も減少すること、結果的に血清生化学的パラメータは腎機能低下を示すこと (Fig. 11C) が示された。この中で、遺伝子 G および H の発現レベルは、亢進状態であったものが有意に低下することが判明した。すなわち、これら2遺伝子は少なくとも一部代償性腎不全期における残存腎の機能亢進のための重要な反応経路の一端を担うことが強く示唆された。

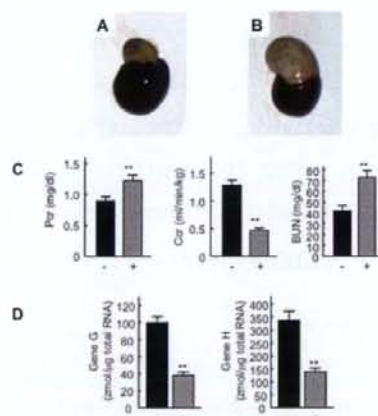


Fig. 11. 細胞増殖阻害薬投与による残存腎肥大の抑制 (A, B)、腎機能の低下 (代償的過剰濾過の低下) (C)、及び遺伝子 G 及び H 発現の低下 (D)。

(3) 末期腎不全時における mTOR 経路の重要性に関する検討

近年、進行性の腎障害である糖尿病性腎症や多発性嚢胞腎の病態進展過程で、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介したシグナル伝達経路が活性化すること、mTOR 阻害薬がこれらの疾患に対し

て著効することが示されている。現在 mTOR 阻害薬は免疫抑制薬また抗腫瘍薬として開発されているものの、末期腎不全などの組織繊維化に対する有効性については未解明である。本研究では、末期腎不全モデルラットに於いて、特に近位尿細管における強い mTOR シグナル経路の活性化を見いだすことができた。これまで、糸球体メサンギウム細胞における活性化など知られてきたが、近位尿細管における機能については全くの未知であった。そこで、mTOR 阻害薬として唯一本邦に於いて使用可能なエベロリムスを用いた検討を進めた。その結果、5/6腎摘出8週目より2週間エベロリムスを皮下投与した結果、近位尿細管におけるリン酸化 mTOR (P-mTOR) レベルの著明な減少と浸潤リンパ球のマーカである ED1 や組織繊維化のマーカである

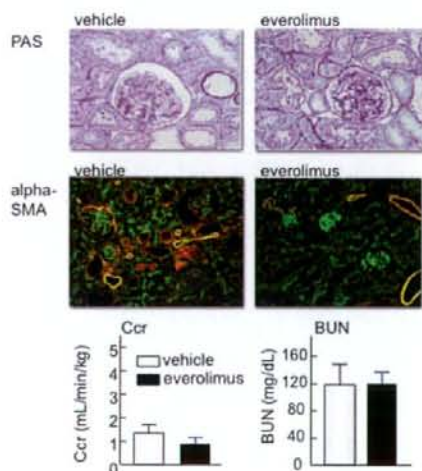


Fig. 12. 5/6腎摘出ラット（術後8週目）へのエベロリムス投与による腎繊維化の軽減効果。Ccr、BUNなど糸球体機能は不変であるが、糸球体の肥大が抑制され、alpha-SMAが減少。

alpha-SMA の減少が観察された (Fig. 12.)。さらに、尿中アルブミンレベルが約 30% にまで低下すること、ほぼ検出不可能なレベルまで低下していた近位尿細管上皮細胞の薬物トランスポータの発現が回復傾向にあることが新たに明らかとなった (Fig. 13)。一方、末期腎不全時における

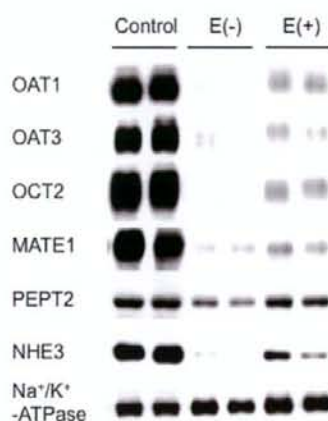


Fig. 13. 5/6腎摘出ラットにおけるエベロリムス投与による尿細管トランスポータタンパク質の発現回復傾向。

mTOR 阻害薬の処置は、クレアチニンクリアランスや BUN に代表される糸球体機能には全く変化を及ぼさなかった。これら近位尿細管における病変進展阻止に mTOR 阻害薬が機能し、結果的に尿細管機能の回復に繋がると想定し、蛍光標識アルブミンの腎挙動について検討を加えた。FITC 標識したヒトアルブミンを静脈内投与し、20 分後に組織を固定、観察した。その結果、エベロリムス投与群ではコントロール群に比べて近位尿細管における FITC シグナルの著明な亢進（再吸

収能の回復)が観察された (Fig. 14)。

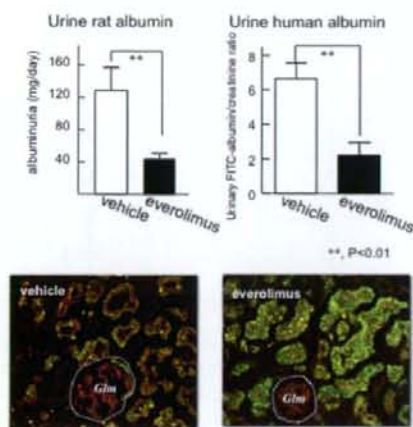


Fig. 14. 5/6腎摘出ラットにおけるアルブミン尿のエベロリムスによる軽減効果および近位尿細管における再吸収能の回復。

#### (4) ヒト腎生検を用いたトランスクリプトーム解析の条件検討

研究初年度では、分担研究者深津の協力により、12例の腎生検組織及び早朝第二尿の提供を受けることができた。Fig. 15に示すように、18S RNA及び28S RNAのシグナル強度と、その間の非特異的なピークが存在しないことなどヒト腎生検組織より抽出した total RNA は微量であるが良質であることが示された。

次に、本 total RNA を用いてラベル化、マイクロアレイ解析を行ったところ、32000プローブの内、約9500プローブを有意に検出可能であることが判明した。すなわち、ヒト腎生検組織など微量検体由来の total RNA においても本解析系においては十分に使用可能であることが示された (Fig. 16)。

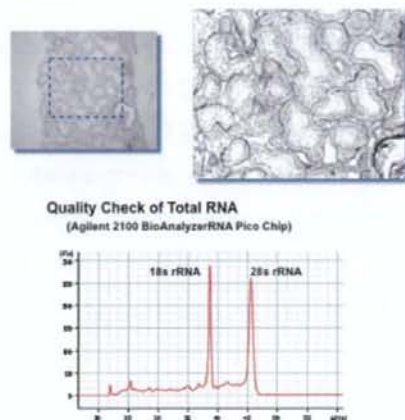


Fig. 15. ヒト腎生検組織の病理写真の例。糸球体は1個認められること、ほぼ近位尿細管が大部分を占めることが認められる。本組織片より抽出した total RNA のクオリティーチェックでは、マイクロアレイ解析に十分な質と量の total RNA が得られていることが認められた。

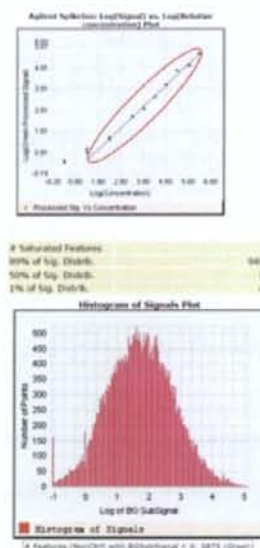


Fig. 16. ヒト腎生検組織由来 total RNA を用いたマイクロアレイ解析の一例。約9500遺伝子の検出が可能であり、ヒト腎生検組織における遺伝子変位の解析は可能である。

#### (5) ヒト尿におけるバイオマーカーの探索

先ず、シスプラチン腎症ラット由来の単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ



解析の結果、慢性腎不全モデルでは認められなかった一部のケモカイン遺伝子について、有意な上昇が認められた。この内、ケモカイン (i) についてシスプラチン投与後の経日的な発現変化を調べたところ、特に投与直後においては単離近位尿細管に於いて発現亢進しているものの、whole kidney を用いた検討では逆に減少する傾向が認められた (Fig. 17)。

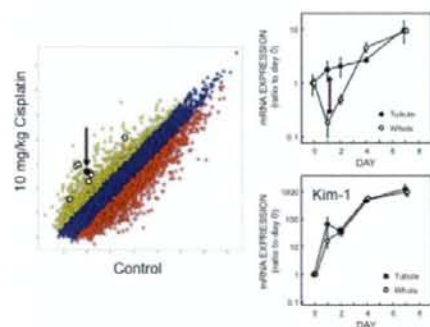


Fig. 17. シスプラチン腎症 (5mg/kg、腹腔内投与後2日目) ラット単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析と、投与後経日的な発現変化。Kim-1 (kidney injury molecule 1) は既知近位尿細管バイオマーカー。単離近位尿細管 (●) と whole kidney (○) において、投与後初期におけるケモカイン (i) 発現の乖離が観察される。

ラットシスプラチン腎症に於いて認められたケモカイン (i) がヒトにおいても尿中に認められるか否かについて、マイクロアレイ解析を行った症例の早朝第二尿を用いて調べた。サスペンションビーズアレイを用いて 17 種類のサイトカイン及びケモカインの尿中への漏出について調べたところ、3 種類のみ検出が可能であった (protein N, O, P)。特に最も高濃度で検出されたもの (protein O) は、

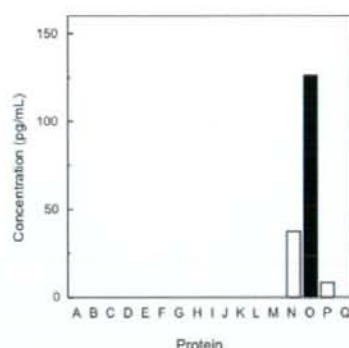


Fig. 18. ヒト尿中サイトカイン、ケモカインの検出。17種類のタンパク質をサスペンションビーズアレイ法にて測定した結果、タンパク質 N、O、Pのみが検出された。他のタンパク質については検出限界未満 (1pg/mL) であった。

ラットで見いだされたケモカイン (i) と一致することが判明した (Fig. 18)。

#### D. 考察

腎機能低下患者においては、潜在的な薬剤性腎障害発症のリスクが高いことから、個々の腎機能に応じた薬物投与設計が求められる。多くの薬物が近位尿細管上皮細胞に蓄積されるものの、日常診療で用いられる腎機能の指標は血清クレアチニン値、BUN 値をはじめ糸球体濾過能を反映するものが殆どであり、近位尿細管機能、特に異物解毒を司る尿細管分泌機能の指標は殆ど知られていない。また、新薬の開発における毒性スクリーニングにおいても同様に、尿細管機能を反映するバイオマーカー「安全性バイオマーカー」の確立が望まれている。

腎臓は、約 10 種類の小器官より構成さ

れるネフロンを最小機能単位としており、ヒトでは左右併せて 100 万個存在すると考えられている。一方、ネフロンを構成する小器官、細胞の多彩なことから、全腎組織「whole kidney」を用いた遺伝子発現解析では注意を要する。すなわち、腎皮質（糸球体、近位尿細管、太いヘンレ上行脚、緻密斑、遠位尿細管、皮質集合管、血管内皮細胞、単球など）あるいは、髄質も含めたいわゆる whole kidney（皮質に加えて、ヘンレループ、細い下行脚、髄質外層太い上行脚、髄質外層集合管、髄質内装集合管も含む）、によって遺伝子発現データは大きく異なるため、研究者間における再現性に乏しいという問題があった (Fig. 19)。

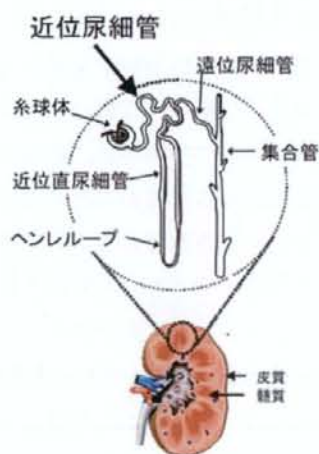


Fig. 19. 腎臓の構造と最小機能単位ネフロン。

本研究では、遺伝子発現解析を行う以前の「試料の純化」を念頭に、ラット腎より近位尿細管のみを単離したものを試料

として検討を進めることとした。その結果、Fig. 6.に示すようにラット腎近位尿細管（主に近位局尿細管）を用いた検討では、近位尿細管に濃縮的に発現する様々なトランスポータ遺伝子のシグナルが強化され、反対に混入下血球細胞由来と考えられる遺伝子群のシグナルが減弱されていることが明らかになり、当初の想定通りの結果が得られた。

次に、これまでの問題点として集積されつつあるバイオマーカー候補の非特異性が挙げられる。例えば、TGF-beta1、PDGFなどは様々な腎症に於いてその発現が上昇することが知られており、単に腎症の発症を検出するためには有用ではあるが、その個体の背景因子に起因するものなのか、投与された薬剤によるものなのか判断が困難である。近年見いだされてきている近位尿細管障害のバイオマーカーとして KIM-1 や NGAL などが精力的に調べられているが、いずれも虚血性腎障害をモデルとして見いだされたタンパク質であり、シスプラチン腎症などでは上昇するが、他の薬剤性腎障害においては明確ではない。このように、バイオマーカー個々の見いだされた経緯を考慮すると、薬剤性腎障害に特異的なバイオマーカーを特定するためには、非薬剤性のバイオマーカーとの分離評価、薬物個々の作用機序を考慮する必要がある。そこで、非薬剤性腎障害のマーカー遺伝子同定とその分子機序解明を目指して、ヒト慢性腎不全の進展過程を反映すると

される 5/6 腎摘出ラットを用いた系統的な検討を進めた。Fig. 7 に示すように、急激な腎垂全摘（ネフロン数の減少）に伴って、術後 2 週にかけて代償性腎不全期（残存ネフロンによる臓器機能の代償作用）とされる。さらに、飼育を継続すると糸球体の硬化、間質の繊維化、単球やリンパ球の浸潤による炎症反応など末期腎不全を反映する像が得られる。本モデルラット由来の単離近位尿細管を用いた遺伝子解析を行った結果、病変の進展に伴う遺伝子プロファイルの変化が観察された (Figs. 8 and 9)。すなわち、代償性腎不全期では、ネフロン数の代償反応と考えられる細胞増殖関連遺伝子群の増大、一方末期腎不全期では炎症反応関連遺伝子の上昇が見られた。この中で、これまで腎障害のマーカーと考えられてきた TGF- $\beta$  や PDGF は全く検出されず、これらの遺伝子は近位尿細管では産生されないことが示された。

得られたデータに基づいて pathway 解析、リアルタイム PCR などマイクロアレイデータの検証を行い、最終的に細胞増殖関連の遺伝子 G、H を抽出した。これら遺伝子の腎不全に伴う発現上昇は近位尿細管に限局するかについて、in situ ハイブリダーゼーション法で調べたところ、期待されたとおり、両遺伝子は一部の近位尿細管のみに発現が誘導されること、連続切片を用いた検討から、多くが同一の細胞に存在することが判明した (data not shown)。従って、これら 2 遺

伝子の発現は、代償性腎不全期における近位尿細管の代償性、あるいは増殖性を証明するものであり、腎組織自身の再生へ向けた反応の事実を視覚化したものと考えられる。これまで、in vitro 細胞レベルにおける両遺伝子の機能解析が広く行われてきたが、in vivo かつ腎臓における発現そのものも不明であった。本研究成果は、初めて両遺伝子の病態生理学的重要性を強く示すものであり、近位尿細管上皮細胞の内、代償的に増殖しうる細胞の特異的なマーカーとなることが示された。すなわち、これら遺伝子の特異的な誘導剤は、ネフロン数の減少に伴う代償性腎不全期にある多くの高齢者において腎機能回復に向けた特異的な標的遺伝子になり得ると期待される。

これらの結果を裏付けるように、5/6 腎摘出直後から細胞増殖阻害薬を 14 日間皮下投与した結果、代償的な残存腎の肥大はほぼ完全に抑制され、同時に過剰な糸球体濾過量の増加の抑制が観察された。すなわち、見かけ上のクレアチニンクリアランスの低下と、BUN の上昇が見られた。このとき、G および H の両遺伝子発現量は、薬物投与していない対照群の約 40% 程度であり、これら遺伝子発現の亢進は、代償性腎不全期における鍵メカニズムであると考えられた (Fig. 11)。

5/6 腎摘出 8 週目以降に於いて、G 及び H の発現量はほぼ消滅する。すなわち、代償性反応は一過性に限られ、以降は腎組織の繊維化に代表されるように末期腎

不全へと進行する。従って、浸潤リンパ球や上皮間質変性(epithelial mesenchymal transition, EMT)によって、近位尿細管上皮細胞が影響を受け、本来の解毒能を失うと想定した。そこで、PKDや糖尿病性腎症において有用性が示されているmTOR阻害薬エベロリムスによる影響について調べた。その結果、alpha-SMAの減少などエベロリムスの薬理効果発現を確認し、尿細管機能についてさらに調べると、ほぼ消滅していた尿細管薬物トランスポートの発現量が回復傾向にあることが判明した(Figs. 12 and 13)。特に、クレアチニンクリアランスやBUNはエベロリムスの影響を全く受けないこと、すなわち本薬物投与の影響は近位尿細管選択的に引き起こされることが明らかとなった。さらに、アルブミン尿が約30%にまで抑制されたことから、近位尿細管における再吸収能の回復を想定し、蛍光標識ヒトアルブミンを用いた動態実験を行った。その結果、Fig. 14に示すように静脈内投与されたヒトアルブミンは近位尿細管上皮細胞に蓄積すること、糸球体濾過を受けた後に再吸収を受けることが示された。一方、対照群では殆どアルブミンの再吸収活性は観察されなかった。これらの結果は、慢性腎不全末期におけるmTOR阻害薬の腎保護効果を念頭にした有用性を示すものであり、薬物による副作用回避、アルブミン尿抑制に伴う体液の膠質浸透圧維持など腎機能低下患者の管理を円滑にするための極めて重要

な情報と考えられる。

ラット虚血再灌流障害、パンコマイシン腎症、シスプラチン腎症を用いたメタボローム、プロテオーム解析の結果から、薬剤性腎障害特異的に検出するためのバイオマーカー候補分子を見いだすことができた(Figs. 1-4)。さらに、低分子化合物についてはLC-MS/MS法による同時定量系の構築も成功し、次年度以降のヒト尿検体を用いた検討へと繋がる成果を得た(Figs. 2-4)。プロテオーム解析では、数種類の尿中タンパク質が見いだされた。いずれも現在知られているバイオマーカーとは異なることから、薬剤性腎障害を診断するためのバイオマーカー分子については、薬物個々の特徴も加味した検討が必要であることが確認された。

アジレントマイクロアレイシステムを用いた検討から、ヒト腎生検を用いたマイクロアレイ解析系の確立を行った。研究初年度では12例の生検組織の収集を終えており、第二年目を併せて目標50例の解析を達成しうる見込である。解析系確立の過程で行ったヒト腎生検を用いた検討では、Fig. 15に示すように質、量ともに十分なtotal RNAの抽出が技術的に達成された。さらに、ラベル化cRNAプローブによるマイクロアレイ解析では、約9500遺伝子の検出に成功し、今後の継続的な解析に十分対応可能な解析系であることが確認された。今後、50例を目標にヒト遺伝子発現プロファイルデータを蓄積し、ラットデータベースとの比較解