

200909002A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 増田 智先

平成22年(2010年)5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21年度 総括研究報告書

研究代表者 増田 智先

平成22年(2010年)5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 | ----- | 1 |
| | 臨床的重要性の解明に関する研究 | | |
| | 研究代表者 増田智先 | | |
| 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 | ----- | 27 |
| | 組織標本の収集 | | |
| | 分担研究者 深津敦司 | | |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 35 |
| IV. | 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 39 |

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))

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 京都大学医学部附属病院薬剤部・講師

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、代償性腎不全期における細胞周期 M 期特異的な因子である Cyclin B2 と Cdc2 が重要であることを見出した。また、シスプラチン腎症モデルラットを用い、尿中 MCP-1 がシスプラチン腎症特異的なバイオマーカーと成り得ることを初めて明らかにした。同時に肺がん患者尿検体を用いた検討によって、尿中の MCP-1 はヒトにおいてもシスプラチン腎症を反映する新しいバイオマーカーであることを明らかにすると同時に、本邦で初めて尿中のヒト KIM-1 の定量系確立に成功した。さらに、ヒト腎生検組織を用いたマイクロアレイ解析を進め、IgA 腎症においては最近注目されている尿中のバイオマーカーである KIM-1、NGAL 及び L-FABP は半数以上の症例において陽性であった。メタボローム解析のデータから、計画初年度で見出された化合物とは異なる分子が抽出され、さらに LC-MS/MS 法による定量系の構築を進めた。

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

研究協力者

乾 賢 一 京都大学医学部附属病院
薬剤部・教授

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

土井俊夫 徳島大学大学院医学研究科
病態情報診断学教授

柳田 素子 京都大学医学研究科生命科
学系キャリアパス形成ユニット
(腎疾患病態解明グループ)・講師

三嶋理晃 京都大学医学部附属病院
呼吸器内科教授

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

A. 研究目的

集中治療室(ICU)における急性腎不

かな発見と適切な対応が望まれている。特に、腎機能低下患者における薬剤性腎障害は、常用量で引き起こされることが臨床上問題視されている。すなわち、腎機能低下患者に対する様々な薬物の使用は、Acute Kidney Injury (AKI)の潜在的なリスクとなるため、腎機能に応じた個別化投与設計に加えて、適切な対症療法施行の根拠となる感受性と特異性を備えたAKIの診断法確立が望まれている。従来、血清クレアチニン (Scr) や血中尿素窒素 (BUN) などの腎機能マーカーに反映されるまでに進行する AKI の検出は困難とされている。さらに、腎生検を用いた組織検査には危険を伴うため、AKI 診断のための腎生検採取と病理検査は原則適応されない。従って、AKI の診断にはより侵襲性の低い分子生物学的指標が必要とされている。Acute Kidney Injury Network (AKIN) によると、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

(Table I)。一方、Scr 及び BUN の感度と特異性が低いため、AKI の早期の検出が困難であること、重篤な場合を除いて AKI における尿量は正常かあるいは増加する場合があること等、既存マーカーの弱点が問題視されている。

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 β -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

Table I. AKI の診断と分類

| Stage | 尿量 | Scr, GFR |
|--------------|--|---------------------------|
| I. Risk | 0.5 mL/kg/hr が 6hr 持続 | Scr 1.5 倍以上上昇、GFR 25%以上低下 |
| II. Injury | 0.5 mL/kg/hr が 12hr 持続 | Scr 2 倍以上上昇、GFR 50%以上低下 |
| III. Failure | 0.3 mL/kg/hr 未満が 12hr または無尿 が 12hr 持続 | Scr 3 倍以上上昇、GFR 75%以上低下 |

GFR (糸球体濾過速度) は、Scr を基に算出された予測値

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。研究計画第2年度である平成21年度では、(1) ラットを用いた検討によるシスプラチン腎症検出のための尿中バイオマーカーの探索を行った。(2) 代償性腎不全期における鍵分子の同定と、その生理的役割の解明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。(4) シスプラチンを投与された肺癌患者由来の尿検体を用い、ラットで見出された尿中バイオマーカーの臨床的有用性について評価を行った。

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1、2、4、7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。

・代償性腎不全期における薬剤性腎障害モデルラットの作製

7週齢の Wistar/ST 雄性ラットを用いて5/6腎摘出处置を行い、2週間飼育した。処置2週間目にバンコマイシン(60mg/kg)、シスプラチン(2mg/kg)を投与し、24時間目の尿及び組織サンプルの回収を行った。

・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4-10例分を1群としてプール、コントロール群、シスプラチン中用量群(5mg/kg投与2日目)、低用量薬剤性腎障害群として Sham 処置ラットにバンコマイシン、シスプラチンを低用量投与したコントロールと、5/6腎摘出处置2週間目のラットに投与した群の計8群を用いた。メタボローム解析は、ウォーターズ社 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、構造が明らかな既知

化合物は 800 種程度であった。その中から、重金属ではない、値の変化が大きい、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。

(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垂全摘 (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 (腎摘出处置 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 O₂ 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) 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社) 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 サスペンションビーズアレイシステムを用いた同時多項目測定法(48項目の定量)を用いて調べた。

(4) 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 のクオリティーチェック

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(1µg)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った。

・ヒト尿を用いたメタボローム解析

腎生検採取と同時に採取された尿検体の中から、IgA腎症、ループス腎炎、膜性腎症については臨床的背景が比較的類似した症例を3例ずつ抽出し、ラット尿を用いた解析と同時にメタボローム解析に供した。得られたデータの主成分分析等はSIMCAプログラムを用いた。

・薬剤性腎障害患者由来の尿検体の採取と解析

シスプラチンを含む化学療法で治療されている肺がん患者の尿検体を、投与直前、投与1、3、7、15、22日目を基本として採取し、BioPlexプロテインビーズアレイによる網羅的ELISA、既知バイオマーカー候補タンパク質等について検討した。なお、腎障害を殆ど起こさない対照としてカルボプラチンを投与された患者の尿を用いた。

(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、ヒト腎生検を用いた網羅的遺伝子解析及びヒト尿検体を用いた解析については「薬剤性腎障害の非侵襲マーカーの探索に関する研究」(G-306、平成21年4月7日付承認)、一方、腎生検採取を伴わない患者由来の尿検体を用いた解析については「尿中バイオマーカー候補分子のプロファイルと薬剤性腎障害との相関解析」(E-640、平成21年6月17日付承認)という題目で、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会による審査・承認を受けている。本計画は平成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)、「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月30日全部改正;平成21年4月1日施行;厚生労働省)を遵守するものである。(上記2つの研究課題は、これまでの研究計画書「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、研究代表者 増田智先及び研究分担者 深津敦司は分担研究者として参画)に対し、本申請計画に特化した内容で改めて倫理委員会の審査・承認を受けた)。

(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、しばしば致命的な腎不全へと悪化する場合が認められる。我々は、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。

今年度では、シスプラチンの中用量モデルとして 5mg/kg 投与後 2 日目のラットを用い、腎機能低下患者に対する常用量の薬物による薬剤性腎障害モデルとして、腎全摘ラットの処置 2 週間目のラット（ヒトの代償性腎不全期にあたる）を選択し、低用量のバンコマイシン（60mg/kg）を静脈内投与後 1 日目のサンプルを、シスプラチンの場合では

2mg/kg を腹腔内投与後 2 日目のサンプルを採取した。得られた尿検体について、クレアチニン濃度を 10mg/dL に調製した後、等量混合し、pooled sample としてメタボローム解析に供した。Table 1.には、各群の生化学的パラメータをまとめた。また、Table 2.には、腎生検組織を採取した症例の内、臨床的背景が類似した 3 例を抽出し、当日の尿についてメタボローム解析を行った。その結果、Fig. 1.に示すように、ラット尿を用いたメタボローム解析では低用量のシスプラチン、バン

Table 1. メタボローム解析に用いたラットの生化学的検査データ

| 処置 | n | Scr | BUN | Ucr | NAG |
|----------------------------|----|------------|------------|----------|-------------|
| 中用量モデル | | | | | |
| コントロール | 4 | 0.4 ± 0.04 | 18.5 ± 1.9 | 142 ± 57 | 0.8 ± 0.49 |
| CDDP (5mg/kg), 48hr | 6 | 0.5 ± 0.10 | 22.8 ± 3.9 | 88 ± 25 | 0.6 ± 0.24 |
| 低用量モデル | | | | | |
| Sham | 8 | 0.5 ± 0.04 | 17.6 ± 3.9 | 89 ± 42 | 73.6 39.2 |
| Sham + VCM (60mg/kg), 24hr | 6 | 0.5 ± 0.05 | 17.9 ± 1.6 | 90 ± 28 | 63.6 ± 24.2 |
| Sham + CDDP (2mg/kg), 24hr | 4 | 0.5 ± 0.10 | 21.3 ± 5.0 | 75 ± 34 | 68.1 ± 15.6 |
| Nx | 13 | 1.4 ± 0.51 | 67.4 ± 33 | 35 ± 9 | 51.4 ± 17.0 |
| Nx + VCM (60mg/kg), 24hr | 5 | 1.0 ± 0.13 | 39.4 ± 9.3 | 41 ± 6 | 53.1 ± 32.3 |
| Nx + CDDP (2mg/kg), 24hr | 7 | 1.2 ± 0.22 | 64.0 ± 13 | 35 ± 19 | 105 ± 70 |

CDDP, cisplatin; VCM, vancomycin; Nx, 5/6 nephrectomized rat; Scr, serum creatinine; BUN, blood urea nitrogen; Ucr, urinary creatinine; NAG, N-acetyl-beta glucosaminidase

Table 2. メタボローム解析に用いた尿検体及びその臨床的背景

| 診断名・性別 | 年齢 | Scr | BUN | Ucr | NAG |
|-----------|----|-----|-----|-----|------|
| IgA腎症・女性 | 24 | 0.6 | 11 | 1.1 | 1.9 |
| IgA腎症・女性 | 33 | 0.8 | 13 | 1 | 6 |
| IgA腎症・女性 | 13 | 0.7 | 12 | 0.3 | 6.5 |
| ループス腎炎・女性 | 17 | 0.6 | 17 | 1 | |
| ループス腎炎・女性 | 27 | 0.5 | 7 | 1.1 | 1.9 |
| ループス腎炎・女性 | 43 | 0.5 | 12 | 0.8 | 5.6 |
| 膜性腎症・女性 | 17 | 0.8 | 14 | 0.4 | 10.7 |
| 膜性腎症・男性 | 79 | 0.9 | 15 | 1 | 18.5 |
| 膜性腎症・女性 | 71 | 0.6 | 9 | 0.5 | 6.2 |

コマイシンの投与によって、いくつかの低分子化合物が尿中の漏出していることが示された。これらの化合物は、代償性腎不全期においても認められず、薬剤性腎障害に選択的な可能性が示唆された。

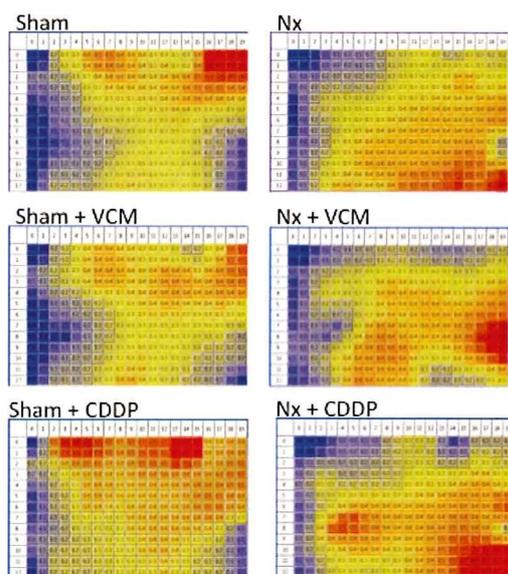


Fig. 1. ラット尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

Fig. 2.には、ヒト尿サンプルを用いたメタボローム解析のデータを示す。解析に使用する時点で臨床的背景が類似している患者を選択したのにも拘わらず、尿中メタボロームデータには大きなばらつきが認められた。この中で、17-19 列、4-8 行付近の化合物については、何れの疾患においても尿中に検出されておらず、この部分の化合物が尿中に認められるような薬剤性腎障害については、鋭敏に検出できることが示唆された。以降は、薬剤性腎障害として臨床的に診断が確定した

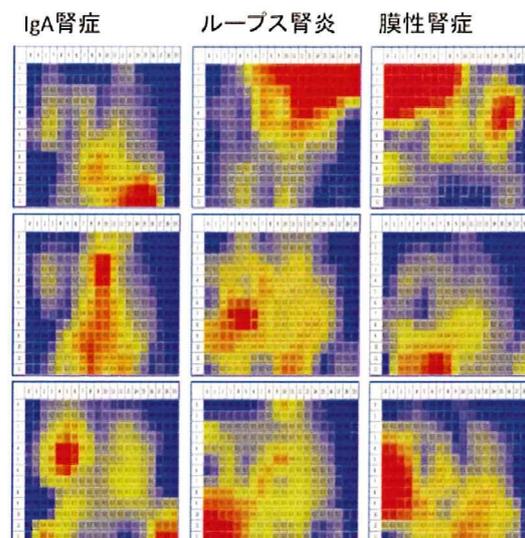


Fig. 2. ヒト尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

患者の尿を用いた解析を進め、IgA 腎症、ループス腎炎または膜性腎症など殆どが自己免疫性疾患であることに着目し、薬剤性の AKI と自己免疫性の慢性腎臓病 (CKD) との判別を可能にする尿中マーカーの同定に繋げる予定である。

(2) 慢性腎不全モデルラットを用いた病変進展の鍵分子の同定

Fig. 3.に単離尿細管各分節の像を示す。本研究では、薬剤性腎障害のマーカーを探索するに先だって、特に薬物の集積と腎障害の発現が問題となる近位曲尿細管に着目して検討を進めた。

5/6 腎摘出处置後経時的に採取した単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析の結果、ヒトにおける代償性腎不全期

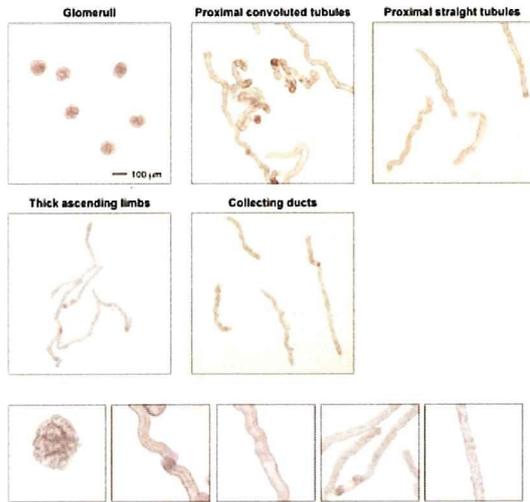


Fig. 3. 単離尿管各分節

に相当する病期において細胞周期関連の遺伝子発現が大きく変化していること、特に細胞分裂期 (M 期) の分子 Cyclin B2 及び CDK-1 (Cdc2) が有意に変化していることを見出した。次に、これら分子の病態生理学的意義について検討を進めるため、細胞増殖シグナルの上流に位置する mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の阻害薬としてエベロリムスを、Cdc2 の直接的な特異的阻害薬として 2-cyanoethyl alsterpaullone (CE-ALP) を選択し、*in vivo* における個々の分子の役割について検討を行った。

Fig. 4. には 5/6 腎摘出ラットに対するエベロリムス投与の影響に関わる結果を示す。エベロリムスの投与によって、分裂細胞数 (Ki67 陽性の細胞) は著明に減少し、結果として腎組織の肥大も抑制さ

れている。

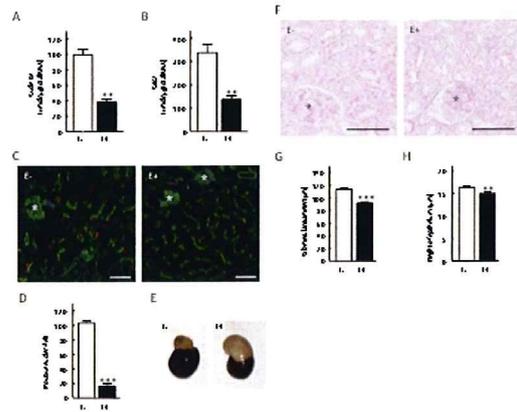


Fig. 4. mTOR阻害薬エベロリムス投与による代償反応の抑制とそれに基づく腎組織肥大の抑制。エベロリムス投与によって、その下流に位置するCyclin B2 (A)やCdc2 (B)のmRNA発現量は低下、Ki67をマーカーとする分裂細胞数の低下 (C、D)、腎組織肥大の抑制 (D)が認められる。さらに、腎病理切片 (F) では、糸球体径 (G) および尿管上皮細胞の丈 (H) も抑制されることが示された。

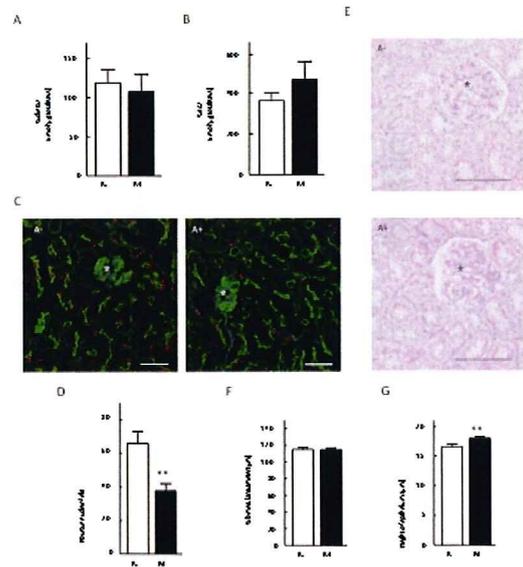


Fig. 5. Cdc2阻害薬CE-ALP投与による代償反応の抑制効果。CE-ALP投与によって、Cyclin B2 (A)やCdc2 (B)のmRNA発現量は変化しないものの、Ki67をマーカーとする分裂細胞数は約半数に低下 (C、D)した。一方、腎病理切片 (F) では、糸球体径 (G) および尿管上皮細胞の丈 (H) の大きな変化は認められず、尿管上皮細胞については細胞分裂ができずに細胞個々の肥大化に繋がること示された。

次に、Cdc2 を直接的に阻害する CE-ALP 投与の効果について検討を加え

た (Fig. 5)。mTOR 阻害薬の投与とは異なり、CE-ALP 投与では細胞の分裂が阻害されたことによって、上皮細胞個々の肥大に繋がることが示された。従って、代償性腎不全期においては、細胞個々の肥大も起こるものの、過剰な増殖反応の亢進によって細胞数の増加に伴う組織肥大も引き起こされていることが示唆され、この過程に Cyclin B2 と Cdc2 が関わるということが明らかになった。そこで、Cdc2 が細

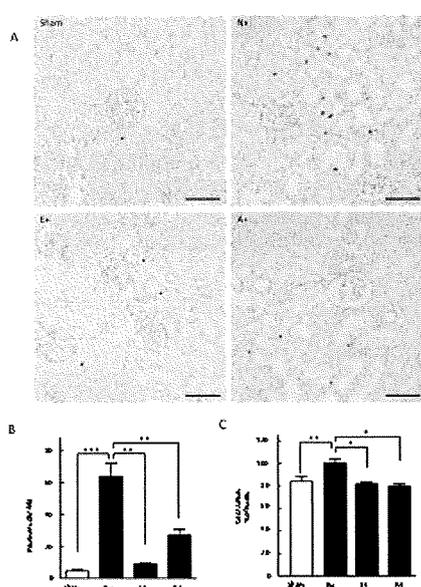


Fig. 6. mTOR阻害薬エベロリムス並びにCdc2阻害薬CE-ALP投与によるM期細胞数の減少。M期細胞のマーカとして知られるリン酸化Histon H3を指標として、分裂細胞数の変化を調べた結果 (A)、エベロリムス及びCE-ALPの処置によって、著しい細胞分裂の抑制が引き起こされることが認められ、同時に細胞溶解液におけるCdc2活性の抑制も確認された。

胞周期中の M 期 (有糸分裂期) 特異的に機能するタンパク質であることに着目し、M 期の指標として汎用されるリン酸化 Histon H3 について調べた (Fig. 6)。その結果、エベロリムス及び CE-ALP 投与によって Histon H3 陽性の細胞数が顕著に低下し、マイクロアレイで見出された

Cyclin B2 と Cdc2 がラット in vivo において機能すること、特に代償性腎不全期において誘導され、代償反応の鍵分子としての役割を果たすことが強く示唆された。

(3) ラットシスプラチン腎症モデルを用いた薬剤性腎障害のマーカー探索

シスプラチンは、肺がんをはじめ最も広く用いられる抗腫瘍薬であり、骨髄抑制が弱い事が特徴としてあげられている。一方、シスプラチンの用量規制因子は腎毒性であることから、殆ど入院治療及び多様の補液による腎保護作用を狙った手順が用いられるが、十分な効果を発揮していない。また、シスプラチンは近位尿細管側底膜に発現する有機カチオントランスポート OCT2 によって濃縮的に近位尿細管上皮細胞に集積する。従って、一般的な腎機能マーカーである Scr や BUN の変化に先だって近位尿細管障害に深く関連するマーカーの変化が想定されるが、未だに不明である。これらの背景により、先ずラットを用いてシスプラチン投与による近位尿細管障害を反映する分子の探索を試みた。ラットに低用量 (2mg/kg) と高用量 (10mg/kg) のシスプラチンを腹腔内投与し、2 日目の近位尿細管を 20mm 単離、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Table 3 にまとめたように、サイトカイン、ケモカインなど炎症反応に関連する遺伝子の上昇が認められた。

Table 3. シスプラチン腎症ラットの単離近位尿細管 (Tubule) または全腎組織 (Whole) を用いたマイクロアレイ解析によって見出されたシスプラチン投与によって発現変化を示す遺伝子

| Gene Name | Tubule | | | | Whole | |
|--|--------------------------|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | 2 mg/kg Cisplatin | | 10 mg/kg Cisplatin | | 10 mg/kg Cisplatin | |
| | log ₂ (ratio) | P value | log ₂ (ratio) | P value | log ₂ (ratio) | P value |
| ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2 | 0.04 | 0.89 | -1.56 | 0.01 | N.D. | |
| artemin | 0.02 | 0.96 | 0.13 | 0.74 | N.D. | |
| bone morphogenetic protein 3 | N.D. | | N.D. | | -2.31 | 0.23 |
| chemokine (C-C motif) ligand 2 | N.D. | | 3.22 | <0.01 | 1.75 | 0.01 |
| chemokine (C-C motif) ligand 3 | 1.10 | 0.30 | N.D. | | N.D. | |
| chemokine (C-C motif) ligand 4 | -0.08 | 0.81 | -0.01 | 0.96 | -0.14 | 0.62 |
| chemokine (C-C motif) ligand 5 | 0.27 | 0.52 | -0.31 | 0.22 | -0.87 | 0.01 |
| chemokine (C-C motif) ligand 6 | -0.63 | 0.26 | 0.17 | 0.69 | 0.66 | 0.03 |
| chemokine (C-C motif) ligand 12 | -0.33 | 0.57 | -0.38 | 0.46 | -0.19 | 0.62 |
| chemokine (C-C motif) ligand 17 | N.D. | | N.D. | | 1.68 | <0.01 |
| chemokine (C-C motif) ligand 19 | 0.35 | 0.49 | 2.82 | 0.02 | 3.32 | 0.02 |
| chemokine (C-C motif) ligand 24 | -0.41 | 0.40 | -0.47 | 0.31 | -0.13 | 0.75 |
| chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | N.D. | | 2.46 | 0.02 | N.D. | |
| chemokine (C-X-C motif) ligand 9 | 0.14 | 0.63 | -0.89 | 0.14 | N.D. | |
| chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | 0.09 | 0.89 | 2.70 | 0.08 | 2.05 | 0.04 |
| chemokine (C-X-C motif) ligand 16 | 0.20 | 0.72 | -0.18 | 0.81 | 0.20 | 0.52 |
| cysteine rich protein 61 | 0.23 | 0.68 | 1.30 | 0.07 | 1.45 | 0.11 |
| diphtheria toxin receptor | N.D. | | 3.98 | 0.02 | 3.35 | 0.00 |
| epidermal growth factor | -0.54 | 0.36 | -2.40 | 0.04 | -3.26 | 0.02 |
| endothelial cell-specific molecule 1 | -0.21 | 0.56 | -0.19 | 0.66 | -1.32 | 0.03 |
| fibroblast growth factor 1 | -0.10 | 0.74 | -1.08 | 0.05 | -0.30 | 0.52 |
| fibroblast growth factor 9 | 0.63 | <0.01 | -1.42 | <0.01 | -0.97 | 0.07 |
| fibroblast growth factor 10 | 0.72 | 0.44 | N.D. | | N.D. | |
| fibroblast growth factor 13 | 0.74 | 0.15 | -1.13 | 0.03 | N.D. | |
| growth differentiation factor 1 | 0.09 | 0.81 | -0.08 | 0.86 | -0.21 | 0.55 |
| growth differentiation factor 6 | -0.29 | 0.63 | -0.71 | 0.24 | N.D. | |
| granulin | 0.25 | 0.34 | -0.19 | 0.59 | 0.19 | 0.40 |
| hepatoma-derived growth factor | 0.57 | 0.53 | 0.78 | 0.39 | N.D. | |
| insulin-like growth factor 1 | -0.93 | 0.37 | -1.45 | 0.24 | -1.79 | 0.04 |
| insulin-like growth factor 2 | N.D. | | N.D. | | 0.86 | 0.12 |
| IK cytokine | 0.05 | 0.89 | 0.76 | 0.17 | 0.69 | 0.16 |
| interleukin 1 alpha | -0.27 | 0.77 | -0.68 | 0.52 | -1.48 | 0.16 |
| interleukin 1 beta | 1.42 | 0.19 | 2.52 | 0.02 | 0.92 | 0.15 |
| interleukin 13 | -0.76 | 0.08 | -0.13 | 0.79 | N.D. | |
| interleukin 15 | 0.37 | 0.12 | -0.68 | 0.09 | -0.28 | 0.43 |
| interleukin 16 | 0.09 | 0.69 | -0.58 | 0.08 | -0.11 | 0.74 |
| interleukin 1 receptor antagonist | 0.54 | 0.24 | 0.66 | 0.25 | N.D. | |
| inhibin beta C | -0.46 | 0.10 | -0.79 | 0.04 | 0.82 | 0.02 |

| | | | | | | |
|---|-------|------|-------|------|-------|-------|
| insulin 1 | -0.13 | 0.72 | 0.27 | 0.43 | 0.68 | 0.28 |
| leukocyte cell-derived chemotaxin 2 | -0.41 | 0.49 | -2.67 | 0.01 | N.D. | |
| midkine | -0.18 | 0.54 | 0.59 | 0.18 | 0.88 | 0.10 |
| melanoma inhibitory activity 2 | 0.37 | 0.42 | -1.25 | 0.03 | 0.28 | 0.62 |
| macrophage migration inhibitory factor | -0.42 | 0.29 | -0.94 | 0.07 | -0.26 | 0.54 |
| neuregulin 1 | 0.70 | 0.26 | 1.40 | 0.14 | -2.94 | <0.01 |
| neuregulin 2 | 0.21 | 0.71 | 0.13 | 0.77 | 0.56 | 0.07 |
| pre-B-cell colony enhancing factor 1 | 0.41 | 0.24 | 0.86 | 0.04 | 0.92 | 0.03 |
| platelet derived growth factor, alpha | -0.41 | 0.16 | 1.51 | 0.01 | 0.67 | 0.10 |
| platelet-derived growth factor, C polypeptide | 1.34 | 0.04 | -2.00 | 0.01 | N.D. | |
| pleiotrophin | -1.30 | 0.31 | -0.22 | 0.81 | 0.63 | 0.30 |
| associated molecule with the SH3 domain of STAM | 0.23 | 0.50 | -0.77 | 0.08 | -1.03 | 0.01 |
| transforming growth factor, beta 1 | N.D. | | N.D. | | N.D. | |
| transforming growth factor, beta 2 | -0.19 | 0.23 | -1.36 | 0.03 | N.D. | |
| tumor necrosis factor superfamily, member 2 | N.D. | | N.D. | | N.D. | |
| vascular endothelial growth factor C | -1.43 | 0.04 | -1.20 | 0.06 | N.D. | |

これらの中で、CCL2 (MCP-1) に着目し、以降の検討を行った。まず、ラットシスプラチン腎症において MCP-1 発現の局

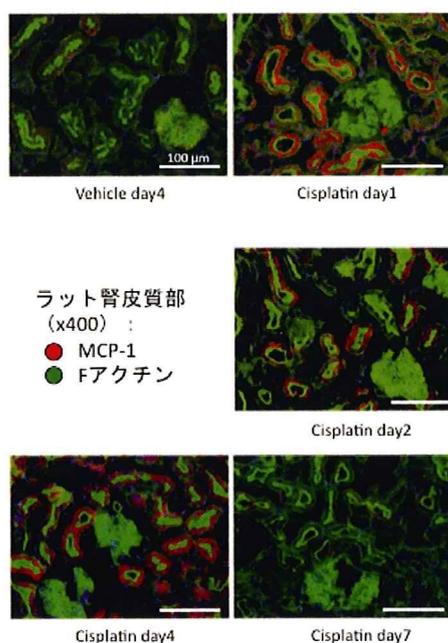


Fig. 7A. ラット腎皮質部分におけるMCP-1の局在。

在について検討した結果、予想されたとおり、MCP-1 の発現は近位尿細管選択的であった (Fig. 7A)。一方、腎髄質においては間質に強く染まることも認められた (Fig. 7B)。また、AKIのマーカーとして Bonventre 教授が発見、展開している Kim-1 について近位尿細管障害を反映するマーカータンパク質の陽性コントロールとして比較検討した。その結果、単離近位尿細管及び全腎組織を用いた mRNA 発現レベルの経時変化では、全腎組織の MCP-1 発現はシスプラチン投与直後に一端減少するのに対し、Kim-1 の発現量は上昇し続けた。一方、単離近位尿細管を試料とした場合では、MCP-1 の発現量は Kim-1 と同様に上昇し続けた (Fig. 8)。

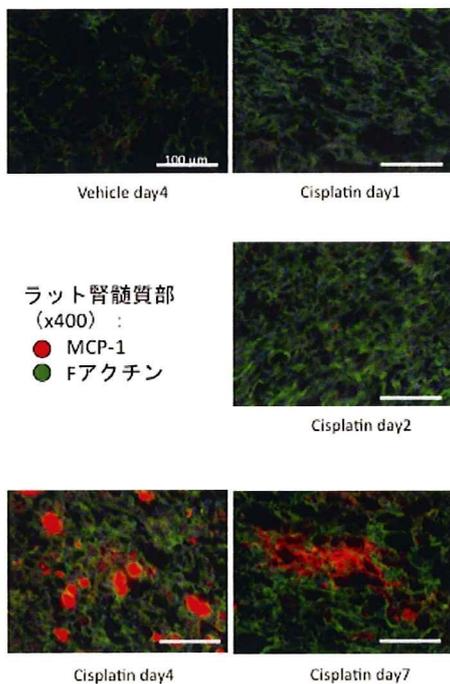


Fig. 7B. ラット腎髄質部分におけるMCP-1の局在。

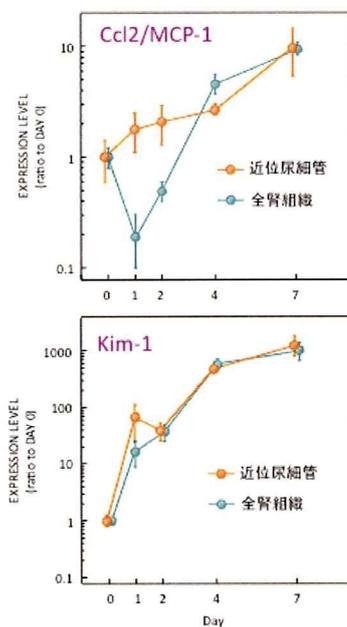


Fig. 8. シスプラチン投与後のラット単離近位尿細管及び全腎組織におけるMCP-1、Kim-1 mRNA発現量の推移。

さらに、ラット尿を用いて尿中バイオマーカーとしての MCP-1 の有用性について、Kim-1 を対照に比較検討した結果、

尿中の MCP-1 はシスプラチン投与直後から上昇をはじめ、血漿中のクレアチニンや BUN の上昇が認められる数日前に既に上昇を示すこと、シスプラチン投与翌日では既にコントロールラットの 3 倍値となっていることが判明した (Fig. 9)。シスプラチン投与 7 日目、腎組織病変が回復傾向にある中において、尿中の Kim-1 は変化を示さなかったが、MCP-1 は組織の病変に応じて低下傾向を示した。

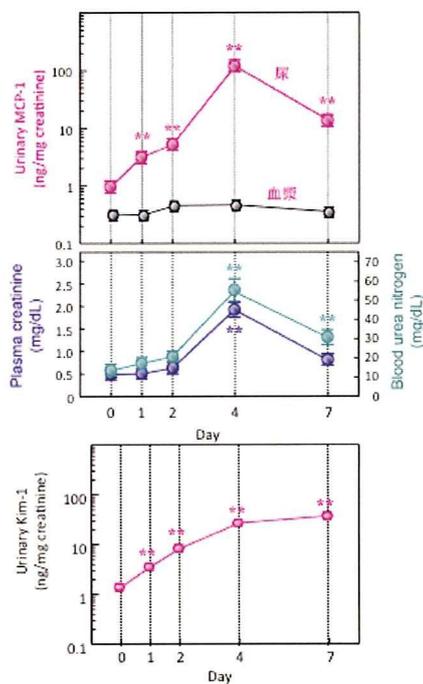


Fig. 9. シスプラチン投与後のラット尿における MCP-1 と Kim-1 の検出。 ** P<0.01 vs Day 0

(4) ヒト腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析

計画第 2 年目ではさらに多数の協力を頂き、腎生検組織の収集とトランスクリプトーム情報の収集ができた。2008 年 10 月～2010 年 3 月半ばまでに収集した症例数は 41 例 (男性 20 例、女性 21 例)、年

年齢の中央値は46歳（13～79歳）、腎生検採取時の血清クレアチニン値の中央値は0.9（0.5～2.8）、原疾患としてIgA腎症13例、膜性腎症6例、ループス腎炎4例、ANCA関連腎炎2例、その他16例であった。腎生検を採取された患者の殆どは、その前後においてステロイド薬を投与されていたが、その他腎障害が問題になる薬物投与及びその薬歴は存在しなかった。マイクロアレイ解析及びバリデーションを終えた30例を中心にクラスター分析を行った結果をFig. 10.にまとめる。

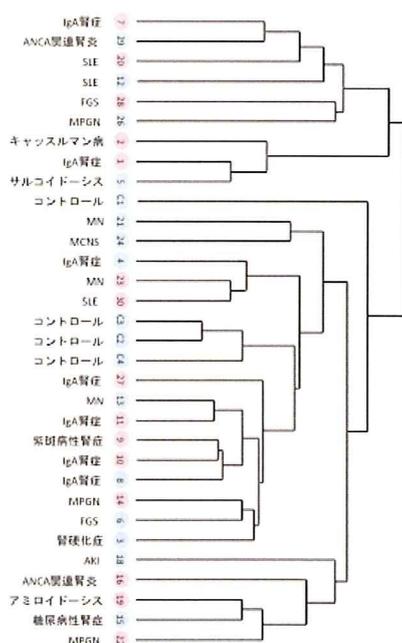


Fig. 10. ヒト腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析のクラスター分析（コントロールには健常白人男性のtotal RNAを用いた）。

（5）シスプラチン投与を受けた肺癌患者における尿中バイオマーカーの推移
外科的切除術が不能と診断された肺癌患者の中で、腎予備能を保持した患者にはシスプラチンを中心的抗腫瘍薬とした化学療法（レジメン）が選択される。

多くの場合、投与量を調節し、大量の補液（ハイドレーション）を行うことによってシスプラチンの腎毒性発現を最小限にしようとする試みが為されてきた。一方、3週間に1回シスプラチンを投与される患者において、回数を重ねる毎に腎機能が徐々に低下することが指摘されており、その要因が不明であるだけでなく鋭敏な診断法も未確立であった。本研究では、ラットを用いて見出された尿中のMCP-1などのバイオマーカーが従来のAKIマーカーに比して、遜色ないか否か、あるいはより有用か否かについて検証することを目的とし、シスプラチン投与が決定した肺癌患者の尿を用いた検討を進めた。なお、陰性コントロールとして、

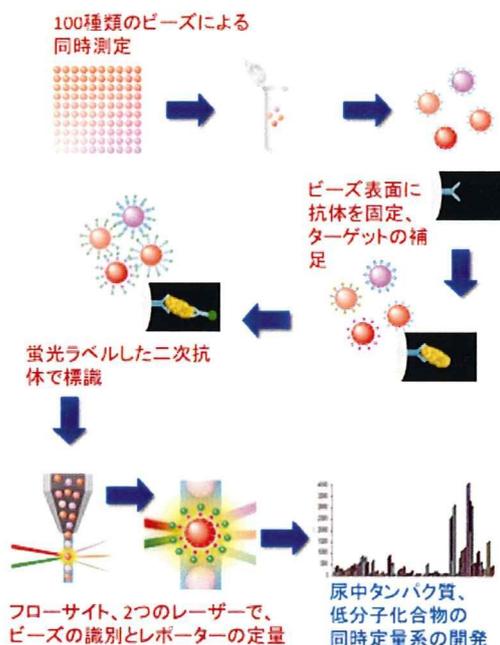


Fig. 11. サスペンションビーズアレイの測定原理
腎毒性が極めて弱く骨髄毒性が問題となるカルボプラチンの投与を受けた患者を

調べた。

サスペンションビーズアレイ法を用いて 40 種類のサイトカイン、ケモカイン及び接着分子等を調べ、近年尿中のバイオマーカーとして注目を集めている Liver type fatty acid binding protein (L-FABP)、Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)、Clusterin、Cystatin C、Osteopontin、beta2-microglobulin 及び Albumin については個々の ELISA 法を用いた。また、human KIM-1 については Bonventre 教授よりサスペンションビーズアレイ法 (Fig. 11) に特化した試薬 (標識抗体、KIM-1 標品) の譲渡を受け、同様の手法にて検討した。Table 4a. (ELISA 法) 及び Table 4b. (サスペンションビーズアレイ法) それぞれに検討したタンパク質のリストを示す。

Table 4a. ヒト尿を用いて調べたタンパク質リスト

| 測定項目 | 検出範囲 | 濃度 |
|---------------------|------------|-------|
| ・ ELISA 法 | | |
| MCP-1 | 16-1000 | pg/mL |
| NGAL | 10-1000 | pg/mL |
| L-FABP | 6.25-200 | ng/mL |
| Osteopontin | 5-320 | ng/mL |
| Albumin | 6.25-10000 | ng/mL |
| Cystatin C | 3.12-100 | ng/mL |
| Clusterin | 0.001-5.00 | ug/mL |
| beta2-microglobulin | 0.4-12 | pg/mL |

次に、尿採取に協力いただいた肺がん症例について、シスプラチンまたはカルボプラチン投与初回であった症例数のまとめと、全例のまとめをそれぞれ Table 5a.、Table 5b. として示す。

Fig. 12、Fig. 13 にはそれぞれシスプラ

チン、カルボプラチンを投与された肺がん患者における尿中のバイオマーカータンパク質の推移について示している。

Table 4b. ヒト尿を用いて調べたタンパク質リスト

| 測定項目 | 検出範囲 | 濃度 |
|------------------|-----------|-------|
| ・ サスペンションビーズアレイ法 | | |
| IL-1beta | 2.3-38442 | pg/mL |
| IL-2 | 1.3-32756 | pg/mL |
| IL-4 | 0.3-5128 | pg/mL |
| IL-5 | 2.3-38589 | pg/mL |
| IL-6 | 1.9-32112 | pg/mL |
| IL-7 | 2.5-41044 | pg/mL |
| IL-8 | 1.6-26454 | pg/mL |
| IL-10 | 1.7-28129 | pg/mL |
| IL-12 (p20) | 2.3-38523 | pg/mL |
| IL-13 | 2.5-41664 | pg/mL |
| IL-17 | 2.1-35471 | pg/mL |
| G-CSF | 1.6-27619 | pg/mL |
| GM-CSF | 0.7-11547 | pg/mL |
| IFN-gamma | 1.6-26452 | pg/mL |
| MCP-1 | 1.7-28406 | pg/mL |
| MIP-1beta | 1.1-18330 | pg/mL |
| TNF-alpha | 5.5-90132 | pg/mL |
| IL-1a | 1.6-26347 | pg/mL |
| IL-2Ra | 0.6-9670 | pg/mL |
| IL-3 | 1.9-32595 | pg/mL |
| IL-12(p40) | 2.0-33543 | pg/mL |
| IL-16 | 0.9-15425 | pg/mL |
| IL-18 | 0.8-13984 | pg/mL |
| CTACK | 1.7-28413 | pg/mL |
| GROalpha | 1.8-29883 | pg/mL |
| HGF | 2.0-34094 | pg/mL |
| ICAM-1 | 2.0-34051 | pg/mL |
| IFN-alpha2 | 0.2-3516 | pg/mL |
| LIF | 0.9-16316 | pg/mL |
| MCP-3 | 1.2-19702 | pg/mL |
| M-CSF | 1.9-31018 | pg/mL |
| MIF | 1.4-23236 | pg/mL |
| MIG | 0.4-7782 | pg/mL |
| b-NGF | 1.0-16843 | pg/mL |
| SCF | 2.1-34911 | pg/mL |
| SCGF-beta | 4.7-77768 | pg/mL |
| SDF-1alpha | 1.8-30049 | pg/mL |
| TNF-beta | 2.2-37407 | pg/mL |
| TRAIL | 1.5-25703 | pg/mL |
| VCAM-1 | 1.4-23856 | pg/mL |
| KIM-1 | 12-200000 | pg/mL |

Table 5a. シスプラチン (CDDP) またはカルボプラチン (CBDCA) 投与1回目であった患者

| | CDDP | | CBDCA | |
|---------------|-------------|---|------------|--|
| 男/女 | 4 | / | 1 | |
| 年齢 | 69.6 ± 6.6 | | 65.4 ± 5.5 | |
| Scr (mg/dL) | 0.7 ± 0.15 | | 0.7 ± 0.11 | |
| BUN (mg/dL) | 13.2 ± 4.9 | | 13.4 ± 4.3 | |
| 投与量 (mg/body) | 99.8 ± 14.4 | | 550 ± 75 | |
| 体重 (kg) | 66.4 ± 13.2 | | 62.4 ± 7.7 | |

Table 5b. シスプラチン (CDDP) またはカルボプラチン (CBDCA) 投与を受けた全患者 (延)

| | CDDP | | CBDCA | |
|---------------|-------------|---|------------|--|
| 男/女 | 9 | / | 6 | |
| 年齢 | 68.1 ± 6.0 | | 65.5 ± 5.4 | |
| 投与量 (mg/body) | 89.8 ± 17.6 | | 544 ± 70 | |
| 体重 (kg) | 63.1 ± 13.0 | | 62.8 ± 8.5 | |

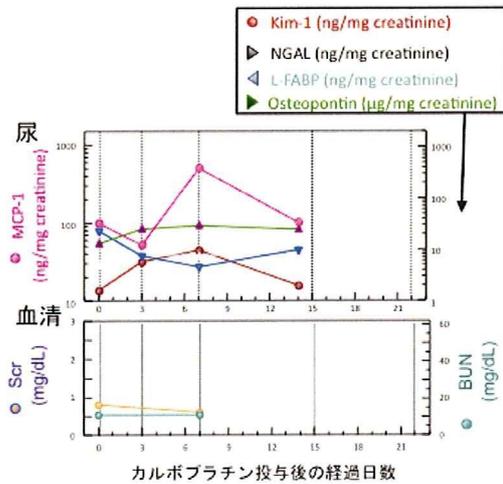


Fig. 13. カルボプラチン投与後の尿中バイオマーカーの推移

55歳、男性、肺癌、紡錘細胞がん、化学療法レジメン：ペバシズマブ/バクリタキセル/カルボプラチン

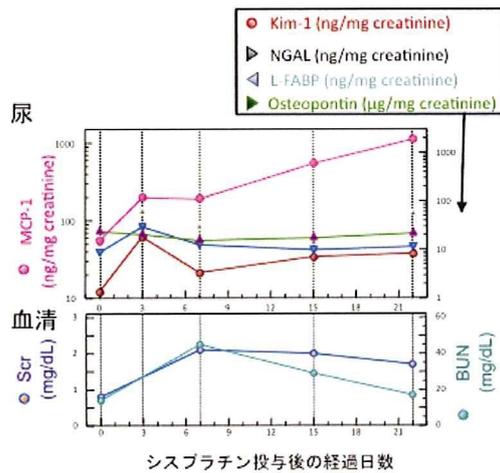


Fig. 12. シスプラチン投与後の尿中バイオマーカーの推移

70歳、男性、小細胞肺癌、化学療法レジメン：エトポシド/シスプラチン→アムルピシン

調べたタンパク質の中で典型的な推移を示した症例を示しているが、概ね類似した経過を示した。この中で、尿中のMCP-1は観察期間を通じて上昇し続けること、一方KIM-1、L-FABP、N-GALは投与直後の3日目に高濃度検出されたが、一端低下し再び上昇傾向を示すこと

が示された。検討した殆どのバイオマーカータンパク質においては、血清クレアチニン値やBUNに比して鋭敏に反応することが明らかとなった。一方、カルボプラチンを投与された患者においては、MCP-1やKIM-1について一端上昇傾向を示したものの時間と共に投与前レベルまで低下することが示された。

さらに、腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析を実施した症例の一部における種々尿中バイオマーカーの濃度と病態との比較解析を行った結果、Fig. 14a. および Fig. 14b. に示すように原発性慢性腎臓病及び糖尿病性腎症など二次性の慢性腎臓病患者の尿では、これらバイオマーカータンパク質が強く表れる傾向にあることが観察された。

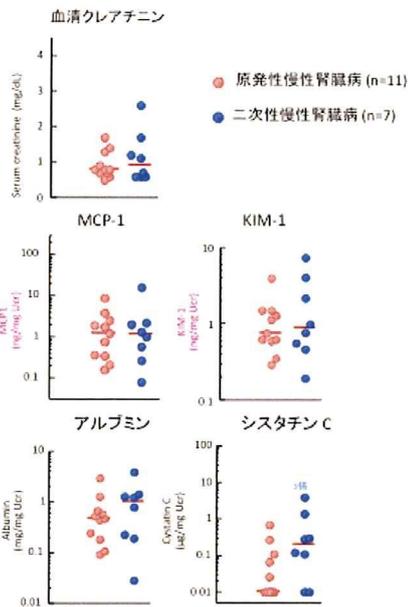


Fig. 14A. CKD患者における各種尿中バイオマーカーの検出

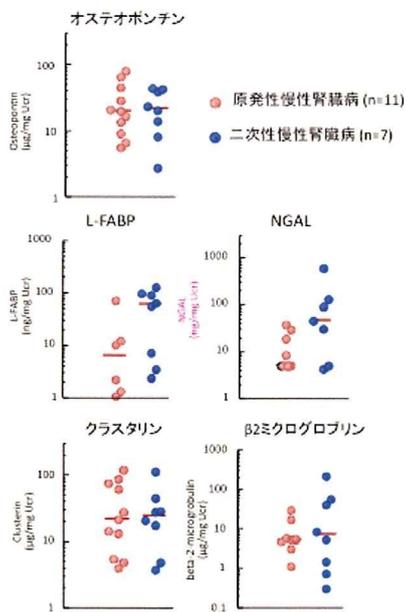


Fig. 14B. CKD患者における各種尿中バイオマーカーの検出

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、ヒトでは左右それぞれに100万個存在すると考えられている (Fig. 3)。一方、ネフロンを構成する小器官、細胞が多様なことから、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、髄質内層集合管も含む) など、解析に用いる組織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. 15)。