

Fig. 15. 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、慢性腎不全の進展過程における代償性腎不全期では、細胞周期、特に細胞分裂期に特異的に発現・機能する Cyclin B2 や Cdc2 が認められ、障害を受け消失した近位尿細管上皮細胞の補完・再生に重要な役割を示すことが明らかとなった (Fig. 16)。

従って、頻尿など徐々に腎機能が低下してくる高齢者においては、上皮細胞の増殖活性が徐々に低下することが想定されることから、これらを阻害する薬物 (mTOR 阻害薬、Cdc2 阻害薬) の投与は、腎機能低下の進行を加速することが想定される。また、腎移植後の免疫抑制薬と

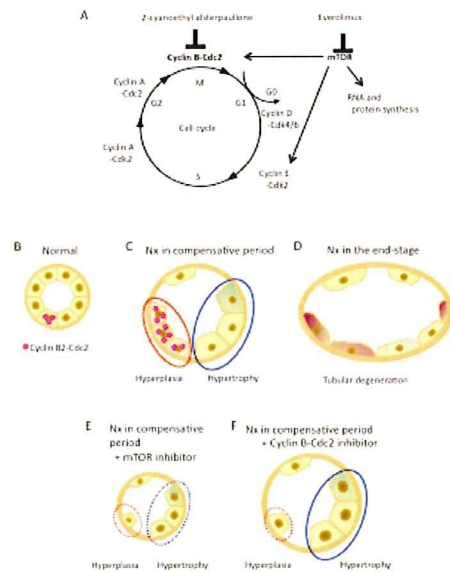


Fig. 16. 代償性腎不全期におけるM期調節因子の役割。M期において特異的に機能するCyclin B2やCdc2は、代償性腎不全期における上皮細胞補完並びに再生の鍵因子として見出された。これらの機能を阻害するmTOR阻害薬やCdc2阻害薬は、上皮細胞の補完の障害に繋がり、腎臓繊維化大抑制を示した。

して使用されるカルシニューリン阻害薬シクロスポリン、タクロリムスに加えて、海外では mTOR 阻害薬シロリムスが使用される場合がある。これまで、術直後の移植腎生着に対するシロリムスを主とした成績は、長期予後に比して芳しくなかった。これらの要因として、腎移植直後の虚血再灌流障害からの回復過程に際し、シロリムスは抑制的に働くことからではないかと推察された。幸い、本邦においてはシロリムスを免疫抑制剤として承認されていないことから、このような問題は起きていないと考えられる。

次に、ラットシスプラチン腎症モデルの単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析によって、サイトカインやケモカインなど炎症反応のメディエーター遺伝子の発現変動が顕著に観察された (Table

3)。これまで、尿中の MCP-1 は IgA 腎症の診断マーカーとして検討が進められてきたが、薬剤性腎障害における有用性については全く不明であった。今回ラットモデル見出された MCP-1 について、新たにシスプラチン腎症に選択的なバイオマーカーであるか否かを中心に検討を進めた。まず、マイクロアレイで見出された遺伝子発現について、リアルタイム PCR による個別の発現変化を調べた所、ラット腎の MCP-1 発現量は全腎組織においては一旦低下した後に上昇を示すことが示された。一方、単離近位尿細管を試料とした場合には、MCP-1 mRNA 発現量はシスプラチン投与後経時的に上昇を示した。一方、近位尿細管で産生される KIM-1 については、全腎組織及び単離近位尿細管何れの場合でも経時的な上昇を示した (Fig. 8)。これらの結果は、腎臓中に存在する単球由来の MCP-1 がシスプラチン投与によって一旦減少し、近位尿細管障害の悪化と共に上昇する MCP-1 とのバランスによって、全腎組織では定価の後に上昇という特徴的な変化を示したと考えられた。Fig. 7 に示す MCP-1 抗体を用いた蛍光免疫染色法によって、腎組織中の MCP-1 はまず近位尿細管上皮細胞中に特異的に発現し、以降髄質間質に油滴のように現れる事が認められた。一方、尿中に見出される MCP-1 は近位尿細管に発現する MCP-1 と良好に対応することから (Fig. 9)、尿中バイオマーカーとしても MCP-1 は、近位尿細管障害を

反映するシスプラチン腎症のバイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。

ヒト腎生検を用いたトランスクリプトーム解析を中心に、薬物を使用しない状態における様々な遺伝子発現情報の収集を試みた結果、同一の病名を診断されていても分子生物学的側面からは大きく異なる事が判明した (Fig. 10)。この内、最も症例数の多い IgA 腎症に着目し、トランスクリプトームデータの中から、尿中バイオマーカーに関わる遺伝子について調べた (Fig. 17)。その結果、Osteopontin、

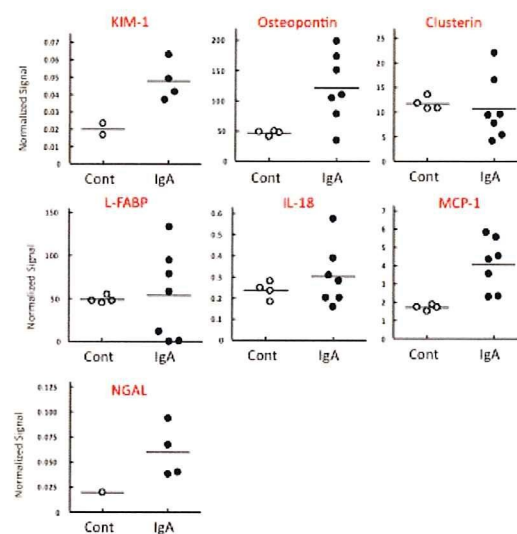


Fig. 17. IgA腎症の患者腎生検組織中における種々バイオマーカーmRNAの検出。IgA腎症患者 (n=7) 由来の腎生検組織をマイクロアレイ解析し、得られたデータの中からバイオマーカー関連遺伝子の発現レベルを抽出した。KIM-1のように7例中4例のみ数値として検出されたモノもあったが、MCP-1は全ての症例で検出された。

MCP-1 は全例で検出され、かつコントロール群に比して高い傾向が認められた。一方、KIM-1 や NGAL については、7例中 4 例のみにおいて検出され、他の 3 例ではシグナルが認められなかった。

L-FABP も同様であった。これらの結果は、KIM-1、NGAL、L-FABP は AKI のマーカーとして知られているが、一部の CKD 患者においても既に高値となっている可能性が高いこと、これらのバイオマーカーが陽性な CKD 患者における AKI 発症（CKD 患者における薬剤性腎障害の発症や虚血性腎障害の発症）を診断するには、既に高値であるバイオマーカーデータのさらなる高レベル化を期待せねばならず、困難を来す可能性が強く考えられた。

上記のデータから、薬物に選択的なバイオマーカーを同定し、従来の尿中バイオマーカーと総合的に診断するアルゴリズムを確立することによって、腎機能低下患者における薬剤性腎障害（drug-induced AKI）の診断が可能になると考えられた。

計画第 2 年度では、肺がん患者を中心に臨床症例の尿検体を用いて、尿中バイオマーカーの評価を進めてきた。カルボプラチンを陰性対照としてシスプラチン投与による腎毒性の検出に関わる検討を進めてきた結果、KIM-1、NGAL、L-FABP は何れも類似した挙動を示し、投与 3 日目に急激に上昇、一旦低下、再び上昇という経過を辿った。一方、我々が発見した MCP-1 については、観察期間を通じて上昇傾向を示し、調べるタイミングに拘わらず腎毒性をモニターするための有用な指標として応用可能であることが強く示唆された。今後、尿中 MCP-1 というバ

イオマーカーが他の AKI においても有用かについて検討を進める必要があるが、少なくともシスプラチン腎症の検出については有用な指標であることが示唆された。

#### E. 結論

研究第 2 年度では、ラット単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析を展開することによって、代償性腎不全期の鍵因子としての M 期調節因子、Cyclin B2 と Cdc2 が見出された。また、シスプラチン腎症モデルラット由来の単離近位尿細管を用いた検討から、尿中の MCP-1 が新たな薬剤性腎障害検出のためのバイオマーカーに成り得ることを発見した。同時に、肺がん患者由来尿検体を用いた検討によって、尿中 MCP-1 がヒトにおいてもシスプラチン腎症を検出するための油棒な尿中バイオマーカーであることが強く示唆された。また、メタボローム解析並びにプロテオーム解析の結果、バンコマイシン腎症及びシスプラチン腎症の検出に有望な尿中候補分子をさらに見いだすことができた。さらに、ヒト腎生検組織を用いたマイクロアレイ解析を 30 例終え、症例の収集も 45 例終えることができた。以上、当初の計画を順調に達成することができ、次年度以降の継続にあたり研究計画の変更は不要であると結論するに至った。

#### F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Nakagawa S, Masuda S, Nishihara K & Inui K: mTOR inhibitor everolimus ameliorates progressive tubular dysfunction in chronic renal failure rats. *Biochem Pharmacol*, 79: 1, 67-76 (2010).
- (2). Nishihara K, Masuda S, Nakagawa S, Yonezawa A, Ichimura T, Bonventre JV, Inui K: Impact of Cyclin B2 and Cell division cycle 2 on tubular hyperplasia in progressive chronic renal failure rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: 4, F923-F934 (2010).
- (3). Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N & Inui K: Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet Genomics*, 20: 2, 135-138 (2010).
- (4). 市村隆治, 増田智先: 【腎における細胞内シグナル伝達と病態生理】腎障害・壊死におけるシグナル伝達 抗生物質と細胞毒. *腎と透析*, 67: 3, 357-362 (2009).
- (5). Kimura N, Masuda S, Katsura T & Inui K-i: Transport of guanidine compounds by human organic cation transporters, hOCT1 and hOCT2. *Biochemical Pharmacology*, 77: 8, 1429-1436 (2009).
- (6). 増田智先、乾 賢一: 免疫抑制薬の動態と薬効・毒性, *治療学*, 43: 12, 1303-1307 (2009).
- (7). Egawa H, Taira K, Teramukai S, Haga H, Ueda Y, Yonezawa A, Masuda S, Tsuji H, Ashihara E, Takada Y & Uemoto S: Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation: a single center experience. *Dig Dis Sci*, 54: 6, 1347-1354 (2009).
- (8). Hosohata K, Masuda S, Katsura T, Takada Y, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Egawa H, Uemoto S & Inui K: Impact of intestinal CYP2C19 genotypes on the interaction between tacrolimus and omeprazole, but not lansoprazole, in adult living-donor liver transplant patients. *Drug Metab Dispos*, 37: 4, 821-826 (2009).
- (9). Hosohata K, Masuda S, Yonezawa A, Katsura T, Oike F, Ogura Y, Takada Y, Egawa H, Uemoto S & Inui K: MDR1 haplotypes conferring an increased expression of intestinal CYP3A4 rather than MDR1 in female living-donor liver transplant patients. *Pharm Res*, 26: 7, 1590-1595 (2009).

- (10). Omote S, Yano Y, Hashida T, Masuda S, Yano I, Katsura T & Inui K: A retrospective analysis of vancomycin pharmacokinetics in Japanese cancer and non-cancer patients based on routine trough monitoring data. *Biol Pharm Bull*, 32: 1, 99-104 (2009).
- (11). Sato E, Yano I, Shimomura M, Masuda S, Katsura T, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Uemoto S & Inui K: Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24: 2, 175-179 (2009).
- (12). Tsuda M, Terada T, Ueba M, Sato T, Masuda S, Katsura T & Inui K: Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 329: 1, 185-191 (2009).
- (13). Tanihara Y, Masuda S, Katsura T & Inui K: Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. *Biochem Pharmacol*, 78: 9, 1263-1271 (2009).
- (14). Yokomasu A, Yano I, Sato E, Masuda S, Katsura T & Inui K: Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of everolimus administered by different routes in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 30: 9, 517-523 (2009).
- (15). Toyohara T, Suzuki T, Morimoto R, Akiyama Y, Souma T, Shiwaku HO, Takeuchi Y, Mishima E, Abe M, Tanemoto M, Masuda S, Kawano H, Maemura K, Nakayama M, Sato H, Mikkaichi T, Yamaguchi H, Fukui S, Fukumoto Y, Shimokawa H, Inui K, Terasaki T, Goto J, Ito S, Hishinuma T, Rubera I, Tauc M, Fujii-Kuriyama Y, Yabuuchi H, Moriyama Y, Soga T & Abe T: SLCO4C1 transporter eliminates uremic toxins and attenuates hypertension and renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 20: 12, 2546-2555 (2009).
- (16). Hosohata K, Masuda S, Yonezawa A, Sugimoto M, Takada Y, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Uemoto S & Inui K: Absence of influence of concomitant administration of rabeprazole on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult living-donor liver transplant patients: a case-control study. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24: 5, 458-463 (2009).

## 2. 学会発表

### ・国際学会

- (1) Satohiro Masuda, Shunsaku Nakagawa,

- Kumiko Nishihara, Ken-ichi Inui:  
Restoration of tubular reabsorption of albumin and expression of membrane transporters by mTOR inhibition in rats with chronic renal failure rats, Renal Week 2009 42nd ASN Annual Meeting and Scientific Exposition (2009.10.29-11.1, San Diego Convention Center, San Diego, USA) (ポスター)
- (2) Kumiko Nishihara, Satohiro Masuda, Atsushi Yonezawa, Shunsaku Nakagawa, Ken-ichi Inui: Microarray-based transcriptional profiling of isolated proximal tubules in the remnant kidneys of rats after 5/6 nephrectomy, Renal Week 2009 42nd ASN Annual Meeting and Scientific Exposition (2009.10.29-11.1, San Diego Convention Center, San Diego, USA) (ポスター)
- (3) Suetonia C. Palmer, Takaharu Ichimura, Masashi Mizuno, Cheng-Chieh Hung, Satohiro Masuda, Joseph V. Bonventre: Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1) Recruits the Hepatocyte Growth Factor Signaling Pathway in Renal Epithelial Cells, Renal Week 2009 42nd ASN Annual Meeting and Scientific Exposition (2009.10.29-11.1, San Diego Convention Center, San Diego, USA) (ポスター)
- (4) Shunsaku Nakagawa, Satohiro Masuda, Kumiko Nishihara and Ken-ichi Inui: Roles of mTOR pathway on progressive tubular dysfunction in chronic renal failure rats, BioMedical Transporters 2009 (2009.8.9-13, Seepark Congress Center, Thun, Switzerland) (ポスター)
- (5) Atsushi Yonezawa, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui: Physiological role of novel riboflavin transporter RFT1, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (2009.7.27-8.1, ICC Kyoto, Japan) (ポスター)
- (6) Atsushi Yonezawa, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui: Identification and functional characterization of novel mammalian riboflavin transporter RFT1, 3rd Asian Pacific ISSX Meeting (2009.5.10-12, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand) (ポスター)
- ・国内学会
- (1) 小澤愛子、西原久美子、米澤 淳、増田智先、乾 賢一：単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析：シスプラチン腎症増悪を反映する分子の探索、日本薬学会第130年会 (2010年3月28-30日、岡山コンベンションセンターほか、岡山市) (一般口演)
- (2) 木村尚子、増田智先、桂 敏也、乾

- 賢一：プロカインアミドの体内動態における有機カチオントランスポーター OCT と H<sup>+</sup>/有機カチオンアンチポーター MATE の役割、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28-30 日、岡山コンベンションセンターほか、岡山市) (一般口演)
- (3) 八尾祉顕、米澤 淳、吉松宏樹、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：脳に発現するリボフラビントランスポーター RFT3 の同定と機能解析、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28-30 日、岡山コンベンションセンターほか、岡山市) (一般口演)
- (4) 木村匡宏、杉本充弘、増田智先、矢野育子、小倉靖弘、上本伸二、乾 賢一：生体肝移植術後のタクロリムス体内動態に及ぼす移植部位の影響、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28-30 日、岡山コンベンションセンターほか、岡山市) (一般口演)
- (5) 増田智先：タクロリムス血中濃度の精度改善と管理の取り組み、第 11 回肝移植術後管理検討会 (2010 年 1 月 30 日、メルパルク京都、京都市) (一般口演)
- (6) 柴田茉衣、矢野育子、安田幸代、横増 晃、細畑圭子、増田智先、池田昭夫、高橋良輔、乾 賢一：抗てんかん薬クロバザム及び活性代謝物 N-デスメチルクロバザム体内動態の母集団解析とファーマコゲノミクス、第 30 回日本臨床薬理学会年会 (2009 年 12 月 1-3 日、パシフィコ横浜、横浜市) (一般口演)
- (7) 中川俊作、増田智先、西原久美子、桂 敏也、乾 賢一：慢性腎不全に対する新規治療標的としての mTOR 経路、第 3 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2009 年 11 月 13-14 日、九州大学病院地区コラボステーション、福岡市) (一般口演)
- (8) Kana Toyama, Atsushi Yonezawa, Masahiro Tsuda, Satohiro Masuda, Ikuko Yano, Tomohiro Terada, Riyo Osawa, Toshiya Katsura, Shimpei Fujimoto, Masaya Hosokawa, Nobuya Inagaki and Ken-ichi Inui : Effect of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) polymorphisms on the disposition of metformin、第 24 会日本薬物動態学会年会 (2009 年 11 月 27-29 日、国立京都国際会館、京都市) (一般口演)
- (9) Keiko Hosohata, Satohiro Masuda, Atsushi Yonezawa, Mitsuhiro Sugimoto, Yasutsugu Takada, Toshimi Kaido, Yasuhiro Ogura, Fumitaka Oike, Shinji Uemoto, and Ken-ichi Inui : Influence of proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult living-donor liver transplant patients: a comparative study、第 24 会日本薬物動態学会年会 (2009 年 11 月 27-29 日、国立京都国際会館、



- 京都市) (一般口演)
- (10) 増田智先、乾 賢一：タクロリムスの血中濃度測定の精度管理と評価：2009、第 45 回日本移植学会総会 (2009 年 9 月 16-18 日、京王プラザホテル、東京) (一般口演)
- (11) 吉田優子、増田智先、安田幸代、寺中裕美、矢野育子、乾 賢一：タクロリムスの血中濃度モニタリングにおける CLIA 法の評価:MEIA 法、EMIT 法および LC/MS/MS 法との比較解析、第 45 回日本移植学会総会 (2009 年 9 月 16-18 日、京王プラザホテル、東京) (一般口演)
- (12) 松本奈津紀、杉本充弘、増田智先、矢野育子、小倉敏弘、上本伸二、乾賢一：生体肝移植患者における術後合併症のリスク分析と予防のためのプロトコルの作成、医療薬学フォーラム 2009 (2009 年 7 月 11-12 日、国立京都国際会館、京都市) (ポスター)
- (13) 米澤 淳、増田智先、桂 敏也、乾賢一：腎 mRNA 発現データベースを活用した新規リボフラビントランスポータ RFT1 の同定 [シンポジウム 4「尿細管輸送体調節と疾患」、第 52 回日本腎臓学会学術総会 (2009 年 6 月 3-5 日、パシフィコ横浜、横浜市) (招聘講演)
- (14) 西原 久美子、増田智先、市村隆治、Bonventre Joseph、乾 賢一：Kidney injury molecule-1 の腎細胞がん治療標的分子としての機能評価、第 52 回日本腎臓学会学術総会 (2009 年 6 月 3-5 日、パシフィコ横浜、横浜市) (一般口演)
- (15) 中川俊作、西原久美子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：慢性腎不全の進展過程における mTOR シグナル経路の役割、第 52 回日本腎臓学会学術総会 (2009 年 6 月 3-5 日、パシフィコ横浜、横浜市) (ポスター)
- (16) 安田幸代、矢野育子、細畑圭子、増田智先、池田昭夫、高橋良輔、乾賢一：成人難治性てんかん患者における低用量クロバザムの体内動態と臨床効果に与える CYP2C19 および CYP3A5 遺伝子多型の影響、第 26 回日本 TDM 学会・学術大会 (2009 年 6 月 13-14 日、朱鷺メッセ、新潟市) (一般口演)
- (17) 遠山佳奈、米澤 淳、増田智先、矢野育子、大澤理代、木村尚子、谷原悠子、桂 敏也、細川雅也、藤本新平、稲垣暢也、乾 賢一：腎排泄型カチオン性薬物メトホルミンのクリアランス予測因子の探索、日本薬剤学会第 24 年会 (2009 年 5 月 21-23 日、静岡コンベンションアーツセンター、静岡市) (一般口演)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
- 本研究で見いだしたバイオマーカー候補分子について、京都大学知財部の協力



を得ながら順次特許出願をする予定である。

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

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 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

研究要旨

腎生検による病理学的診断は、腎臓病患者に対する治療方針の選択に有用性が高い。一方、血清クレアチニン値が高い患者においては、検査そのものの危険性とバランスから適応外となる。従って、薬剤性 AKI を呈したと考えられる患者由来の生検採取は困難であるが、免疫学的原疾患の腎臓病患者由来の生検組織を用いることによって、非特異的かつ原疾患由来の情報をあらかじめ整理することによって、トランスクリプトームで得られる情報の絞込に極めて重要かつ貴重な情報を提供しうると考えられる。本研究では、IgA 腎症などの確定診断のために腎生検採取の適応となった患者に協力を得て、トランスクリプトームに使用すると同時に、病理学的診断とスコア化を行い、データ解析の一助とすることを目的とした。これまで 41 例の協力を得ることができ、20 例程については尿中バイオマーカーの定量データも得た。

A. 研究目的

薬剤性腎障害は腎障害（急性でも慢性でも）の原因として少なくなく、とくに高齢者の腎機能障害、ひいては末期腎不全に至る成因を考える上で重要な役割を果たしている。薬剤性腎障害の機序はさまざまあり、糸球体から濾過された薬剤が尿細管腔から障害、尿細管細胞から排泄される過程で尿細管を障害、血管に働き虚血を生じその結果尿細管、間質を障害、間質でのアレルギー反応などが挙げられる。とくに尿細管からの排泄には尿

細管細胞の薬物の輸送体が関与することから、アレルギー反応と同様、個体差が大きいと考えられる。尿中、血中より病態を反映するバイオマーカーおよび個体差を反映するバイオマーカーを見いだすのが目的である。

前年度より、ヒト尿検体を主にプロテオミクス解析より薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーを探求し、臨床的に薬物投与時の投与方法の確立に応用することを目的として、本分担者はまず普遍的な腎障害

とくに尿細管間質障害のバイオマーカーを検索すべく、さまざまな疾患の腎生検標本での腎組織所見、特に尿細管、間質病変を定量化、スコア化し病変とバイオマーカーとの相関を検討し、適切なバイオマーカーを検索している。その上で薬剤性腎障害でのバイオマーカーを検索する。

## B. 研究方法

### (1) 腎生検の採取

臨床的に的確な適応と判断し腎生検を行った腎疾患患者より、あらかじめインフォームドコンセントに基づいて承諾の得られた患者の組織標本について、糸球体面積、尿細管の病理所見（拡張、細胞変性、細胞脱落、萎縮、円柱、尿細管炎）、間質の病理所見（間質浮腫、細胞浸潤、線維化）を半定量化しスコア化した。これと尿中マーカーであるオステオポニン、L型脂肪酸蛋白（L-FABP）、 $\beta 2$ ミクログロブリン、シスタチンCの相関を調べた。いずれも尿中クレアチニンで補正した。現在まで44例の腎生検標本について検討している。対象はIgA腎症15例（紫斑病性腎炎1例を含む、様々な尿細管間質病変を含む）、膜性腎症5例（尿細管間質病変は軽度）、微小変化群4例（尿細管間質病変は病的にはなし、ただし腎機能障害のあるものを含む）、ループス腎炎4例、ANCA関連腎症2例、サルコイドーシス1例（高度の尿細管間質障害を伴う）などであり、病的な尿

細管、間質の所見の評価ならびに蛋白尿が尿細管に及ぼす影響、血管炎からくる障害などがみられこれらの評価も行っている。

### (2) 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

Table 1. 腎生検を採取した症例の背景

症例数 (n)	41
年齢	46 (13-79)
男/女 (n)	20 / 21
Scr (mg/dL)*	0.9 (0.5-2.8)
BUN (mg/dL)	15 (7-137)
病名 (n)	IgA nephropathy (13) s/o FGS (1) s/o FGS with chronic tubulointerstitialnephritis (1) membranous nephropathy(MN) (6) membranoproliferative glomerulonephropathy (MPGN) (1) minimal change (MCNS) (4) Lupus nephritis (4) DM nephroathy (1) Multiple myeloma (MPGN with mesangiolyis) (1) artero and arteriolonephrosclerosis (1) Purpuranephritis (1) Amyloidosis (1) Cryoglobulinemia MPGN (1) ANCA positive vasculitis (1) ANCA related glomerulonephropathy (1) membranous nephropathy(MN) s/oGVHDrelated (1) Sarcoidosis Granulomatous ninterstitial nephritis (1) non IgA nephropathy (1)

\*年齢、血清クレアチニン値 (Scr)、血中尿素窒素値 (BUN) は、中央値 (レンジ) を示す。

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)。

### C. 研究結果

尿中でのオステオポンティン、L-FABP、 $\beta 2$  ミクログロブリン、シスタチンCを測定できたのは現在までに20例ほどで現在測定を続行中である。

尿細管障害の高度な例ではオステオポンティン、L-FABP、 $\beta 2$  ミクログロブリンのいずれも尿中高値を示した。 $\beta 2$  ミクログロブリンはこれまでもっともデータが多い通り、糸球体から濾過された $\beta 2$

Table 2. 尿中バイオマーカーと組織所見との対応を比較した典型的な症例

	単位	症例 A	症例 B	症例 C
尿中 osteopontin	μg/mg Cr	43.86	2.73	44.47
尿中 L-FABP	ng/mg Cr	95.56	56.03	2.38
尿中 β 2 ミクログロブリン	μg/mg Cr	57.13	214.88	0.75
血清クレアチニン	mg/dL	0.7	1.7	0.6
CRP	mg/dL	0.8	0.2	0.0
尿蛋白	g/day	0.5	0.4	1.3

Cr, クレアチニン

症例 A: 急性期の膜性増殖性糸球体腎炎で糸球体に急性の病変を認める、尿細管間質は巣状に尿細管障害や細胞浸潤を認める（尿中オステオポンティン、L-FABP、β 2 ミクログロブリンすべて増加例）。

症例 B: サルコイドーシスで糸球体はほぼ正常、約 10% の間質に細胞浸潤、肉芽種を認める（オステオポンティンは増加せず L-FABP、β 2 ミクログロブリンの著増例）。

症例 C: ループス腎炎で糸球体は活動性の病変を認めるが尿細管間質病変は軽度である（オステオポンティンのみ著増例）。

ミクログロブリンが尿細管障害により再吸収されないのと、尿細管からの分泌で尿中に増加されるとされ慢性急性を問わず尿細管障害のマーカーとして利用されてきたが特異性に乏しい。L-FABP は最近急性の腎障害で尿細管排泄が増加されるとされるが今回の症例では尿細管障害が病的に高度なものに排泄の増加がみられ急性障害でなくても慢性的に排泄増加することが示唆される。オステオポンティンの尿中排泄についてはこれまで報告は少ない。今回の症例からは慢性的な尿細管間質病変のある症例にオステオポンティンの排泄が多く、L-FABP、β 2 ミクログロブリンと解離しているものが多かった。オステオポンティンは主として浸潤

細胞から産生されると報告されている。その意義を調べるため、腎組織でのオステオポンティンの局在を調べる予定である。以下に具体的な 3 症例を提示する。これまでのデータからこれらの尿中マーカーを組み合わせることである程度の腎尿細管間質の障害の程度と時期（急性期か慢性期か）を想定する可能性が示唆された。本年度症例を増やすとともに、これらを薬剤性腎症に応用する予定である。さらに新たなマーカーの可能性を求めて尿中プロテオミクス解析と腎生検組織所見との相関を調べて行く。

D.E. 現時点では未だ結論および考察をする段階ではない。本年度に収集したサン

プルに関してさらに来年度解析を行なう。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1). Mari Tanaka, Misako Asada, Atsuko Y Higashi, Jin Nakamura, Akiko Oguchi, Mayumi Tomita, Sachiko Yamada, Nariaki Asada, Masayuki Takase, Tomohiko Okuda, Hiroshi Kawachi, Aris N. Economides, Elizabeth Robertson, Satoru Takahashi, Takeshi Sakurai, Roel Goldschmeding, Eri Muso, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, and Motoko Yanagita: Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome, *J Clin Invest* 120: 3, 768-77 (2010).
- (2). Motoko Yanagita: Antagonists of bone morphogenetic proteins in kidney diseases. *Curr Opin Invest Drugs* 11: 3, 315-22 (2010).
- (3). Mima A, Iehara N, Matsubara T, Yamamoto S, Abe H, Nagai K, Matsuura M, Murakami T, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Kondo N, Shigeta R, Yoshikawa K, Takahashi T, Kita T, Doi T and Fukatsu A. Successful treatment of membrano-proliferative glomerulonephritis associated with hepatitis B and C virus simultaneous infection patient. *Clin Nephrol.* 73: 2, 167-169 (2010)
- (4). Atsuko Y. Higashi, Tomokatsu Ikawa, Masamichi Muramatsu, Aris N. Economides, Akira Niwa, Tomohiko Okuda, Andrew J. Murphy, Jose Rojas, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Hiroshi Kawamoto, Toru Kita, and Motoko Yanagita: Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER<sup>T2</sup> *J Immunol* 182: 9, 5633-5640 (2009)
- (5). Kentaro Suzuki, Aris Economides, Motoko Yanagita, Daniel Graf, Gen Yamada.: New horizons at the caudal embryos: coordinated urogenital/reproductive organ formation by growth factor signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 19: 5, 491-496 (2009)
- (6). Motoko Yanagita: BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression *Biofactors* 35: 2, 113-119 (2009)
- (7). Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, Iwano J, Katsura T, Fukatsu A, Doi T & Inui K: Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J Hum Genet.* 54: 1, 40-46 (2009).

- (8). Higashi AY, Nogaki F, Ono T and Fukatsu A.: A young case of kidney failure with thrombotic microangiopathy lesions in renal biopsy caused by accelerated hypertension. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 51: 7, 878-883 (2009) (Japanese)
- (9). Mima A, Toma M, Matsubara T, Shiota F, Iehara N, Abe H, Nagai K, Takahashi T, Matsuura M, Murakami T, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Kondo N, Shigeta R, Yoshikawa K, Kimura T, Kita T, Doi T and Fukatsu A.: Angio-embolization of renal artery pseudoaneurysm after renal biopsy: a case report. *Ren Fail.* 31: 8, 753-755 (2009)
- (10). Kanamori H, Toma M, Fukatsu A.: Improvement of renal function after opening occluded atherosclerotic renal arteries. *J Invasive Cardiol.* 21: 9, E171-E174 (2009)
- (11). Akioka K, Okamoto M, Ushigome H, Nobori S, Suzuki T, Sakai K, Sakamoto S, Urasaki K, Yanagisawa A, Fukatsu A, Yoshimura N. A case of living-related renal transplant from the donor with membranous nephropathy. *Clin Transplant.* 23(Suppl 20), 62-66 (2009)
- (12). Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A; Collaborators developing the Japanese equation for estimated GFR. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis.* 53: 6, 982-992 (2009)
- (13). Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, Iwano J, Katsura T, Fukatsu A, Doi T and Inui K: Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J Hum Genet.* 54: 1, 40-46 (2009)
- (14). 土井俊夫、深津敦司、和田隆志：座談会 ネフローゼ症候群をめぐる最近の話題(特集ネフローゼ症候群—診断と治療の進歩)、日本内科学会誌、98: 5, 1084-1099 (2009)
- (15). 深津敦司:薬剤性腎症(患者さんの背景・病態で考える薬の選び方・使い方のエッセンス) -- (腎・泌尿器)、治療、91, 1069-73 (2009)
- (16). 深津敦司、維持輸液、栄養輸液、経腸栄養の合併症、犯しやすい配合禁忌とその対処(今すぐに役立つ輸液ガイドブック) -- (維持輸液、栄養輸液、経腸栄養)、総合臨床、58,1026-1031 (2009)
- (17). 濱田哲、松原雄、遠藤修一郎、山田幸子、家原典之、中山晋哉、伊丹淳、渡辺剛、坂井義治、深津敦司、ナシル酸ナファモスタットの先発医薬品、後発医薬品両者で異なるアレルギー症状を呈した血液透析患者の1例、日本透析医学会雑誌、42: 7, 541-45 (2009)



## 2. 学会発表

### ・国際学会

- (1). Tomita M: BMP-7 maintains nephron progenitor cells in kidney development, Society of Nephrology 42th Annual Meeting and Scientific, (2009.10.29 - 11.1. San Diego Convention Center, San Diego, USA) (ポスター)
- (2). Endo T: Generation of proximal tubule-specific inducible Cre mice, Society of Nephrology 42th Annual Meeting and Scientific, (2009.10.29-11.1. San Diego Convention Center, San Diego, USA) (ポスター)

### ・国内学会

- (1). 遠藤知美: Genetic lineage tracing を用いた腎再生に関する研究、宮崎サイエンスキャンプ、(2010年2月26日、ワールドコンベンションセンターサミット宮崎、宮崎市) (口演)
- (2). 遠藤知美: Genetic lineage tracing を用いた腎再生に関する研究、第10回腎不全病態治療研究会、(2009年12月21日、全社協 灘尾ホール、東京都) (口演)
- (3). 遠藤知美: Genetic lineage tracing を用いた腎再生分化メカニズムの解析、CKD award、(2009年11月21日、秋葉原コンベンションホール、東京都)) (口演)
- (4). 田中麻理、富田真弓、東淳子、山田佐

知子、奥田智彦、深津敦司、北徹、柳田素子: BMP拮抗分子 USAG-1 はアルポート症候群の糸球体障害を増悪させる (実験腎炎 I-P)、第52回日本腎臓学会学術総会、(2009年6月3日、パシフィコ横浜、横浜市)

- (5). 山田佐知子、富田真弓、遠藤知美、東淳子、田中麻理、遠藤修一郎、奥田智彦、松阪泰三、Graf Daniel Economides Aris N, 深津敦司、北徹、柳田素子: BMP拮抗分子 Tsg はポドサイトにおける BMPシグナルを抑制し、ポドサイト障害を増悪させる (実験腎炎 II)、第52回日本腎臓学会学術総会、(2009年6月4日、パシフィコ横浜、横浜市) (口演)
- (6). 渡部仁美、深津敦司、Rahul Das, Antony Wheatley: 生体蛍光顕微鏡による水腎症マウスにおける血行動態的ならびに構造的変化の観察 (腎血行動態)、第52回日本腎臓学会学術総会、(2009年6月4日、パシフィコ横浜、横浜市) (ポスター)
- (7). 松原雄、安倍秀斉、上田乙也、寺社下浩一、美馬晶、後藤千里、富永辰也、荒木真、鳥越和雄、長井幸二郎、家原典之、福島直、深津敦司、荒井秀典、土井俊夫: Smad1 は糖尿病性糸球体硬化症の進展に重要な役割を果たす (糖尿病性腎症・基礎 I)、第52回日本腎臓学会学術総会、(2009年6月4日、パシフィコ横浜、横浜市) (ポスター)
- (8). 富田真弓、浅田礼光、東淳子、遠藤修

一郎、Economides Aris N, 北徹、深津敦司、柳田素子：BMP-7は腎発生においてネフロン前駆細胞を維持する（遺伝・発生）、第52回日本腎臓学会学術総会、（2009年6月4日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）

- (9). 金森弘志、荒井秀典、藤巻恵一、西山和子、竹岡浩也、深津敦司：透析患者の心理社会的QOLと予後について（続報）、第54回日本透析医学会学術集会、（2009年6月5日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）
- (10). 長尾和浩、塩田文彦、森上和浩、前田利彦、遠藤修一郎、渡部仁美、松原雄、家原典之、深津敦司：Pantocia agglomeransによるPD腹膜炎の一例、第54回日本透析医学会学術集会、（2009年6月5日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）
- (11). 遠藤修一郎、前田利彦、塩田文彦、長尾和浩、森上和浩、渡部仁美、松原雄、家原典之、深津敦司：Calciphylaxisは簡単に治らない～3症例の検討～、第54回日本透析医学会学術集会、（2009年6月5日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）
- (12). 前田利彦：門脈大循環シャントのコイリングにより改善をみた肝性脳症を繰り返す透析導入期患者の1症例、第54回日本透析医学会学術集会、（2009年6月7日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）
- (13). 森上和浩、塩田文彦、長尾和浩、前田

利彦、遠藤修一郎、渡部仁美、松原雄、家原典之、深津敦司、南方保、宮本昌彦：肝膿瘍発症後血液透析中に下部消化管出血をきたし、腹膜透析から血液透析に移行した一例、第54回日本透析医学会学術集会、（2009年6月7日、パシフィコ横浜、横浜市）（ポスター）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

本研究で見いだしたバイオマーカー候補分子について、京都大学知財部の協力を得ながら順次特許出願をする予定である。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishihara et al.	Impact of Cyclin B2 and Cell division cycle 2 on tubular hyperplasia in progressive chronic renal failure rats	Am J Physiol Renal Physiol	298: 4	F923-934	2010
Nakagawa et al.	mTOR inhibitor everolimus ameliorates progressive tubular dysfunction in chronic renal failure rats	Biochem Pharmacol	79: 1	67-76	2010
Toyama et al.	Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients	Pharmacogen et Genomics	20: 2	135-138	2010
Tanaka et al.	Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome	J Clin Invest	120: 3	768-777	2010
Mima et al.	Successful treatment of membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis B and C virus simultaneous infection patient.	Clin Nephrol	73: 2	167-169	2010
市村隆治ら	腎障害・壊死におけるシグナル伝達 抗生物質と細胞毒	腎と透析	67: 3	357-362	2009
Kimura et al.	Transport of guanidine compounds by human organic cation transporters, hOCT1 and hOCT2	Biochem Pharmacol	77: 8	1429-1436	2009

Kajiwara et al.	Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity	J Hum Genet	54: 1	40-46	2009
増田智先ら	免疫抑制薬の動態と薬効・毒性	治療学	43: 12	1303-1307	2009
Egawa et al.	Risk Factors for Recurrence of Primary Sclerosing Cholangitis After Living Donor Liver Transplantation: A Single Center Experience.	Dig Dis Sci	54: 6	1347-1354	2009
Hosohata et al.	MDR1 Haplotypes Conferring an Increased Expression of Intestinal CYP3A4 Rather than MDR1 in Female Living-Donor Liver Transplant Patients	Pharm Res	26: 7	1590-1595	2009
Hosohata et al.	Impact of intestinal CYP2C19 genotypes on the interaction between tacrolimus and omeprazole, but not lansoprazole, in adult living-donor liver transplant patients.	Drug Metab Dispos	37: 4	821-826	2009
Omote et al.	A retrospective analysis of vancomycin pharmacokinetics in Japanese cancer and non-cancer patients based on routine trough monitoring data	Biol Pharm Bull	32: 1	99-104	2009
Tsuda et al.	Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells	J Pharmacol Exp Ther	329: 1	185-191	2009

Sato et al.	Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus	Drug Metab Pharmacokinetics	24: 2	175-179	2009
Tanihara et al.	Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2	Biochem Pharmacol	78: 9	1263-1271	2009
Yokomasu et al.	Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of everolimus administered by different routes in rats	Biopharm Drug Dispos	30: 9	517-523	2009
Toyohara et al.	SLCO4C1 transporter eliminates uremic toxins and attenuates hypertension and renal inflammation	J Am Soc Nephrol,	20: 12	2546-2555	2009
Hosohata et al.	Absence of influence of concomitant administration of rabeprazole on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult living-donor liver transplant patients: a case-control study	Drug Metab Pharmacokinetics	24: 5	458-463	2009
Higashi et al.	Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER <sup>T2</sup>	J Immunol	182: 9	5633-5640	2009
Yanagita	BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression	Biofactors	35: 2	113-119	2009