

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

ブシラミンの腎障害性の in vitro における検討

研究分担者 牛島健太郎 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 助教
研究協力者 津田英利 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 研究員

研究要旨

抗リウマチ薬であるブシラミンを投与した患者検体から得られたデータを解析する上で、培養細胞や動物を用いた毒性学的な基礎データを利用することは有用と考えられる。そこで本研究では、まず、ブシラミンおよび代謝物の培養細胞に対する細胞障害性を明らかにした。さらに、臨床用量に相当する濃度のブシラミンあるいは代謝物を 293 細胞に曝露した際に発現量が変化する遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子発現と細胞障害との関連を検討した。

A. 研究目的

ブシラミンは 1987 年に上市されて以来、第一選択薬としては非常に有用な抗リウマチ薬である。しかしまた、有害反応の一つとして蛋白尿を伴う、膜性腎症を含む腎障害も良く知られている。しかし、この現象は前臨床段階における動物実験では観察されておらず、詳しい機序は不明である。最近の後ろ向き研究でも、皮膚疾患に次ぎ、蛋白尿が多く報告されている。(表 1)。ブシラミン(SA96)は活性体であるが、投与後ヒト血中に 3 種類の代謝物が確認されている(図 1)。SA672 を除く 2 種類の代謝物は、親化合物である SA96 と同等の血中濃度を示し、かつ同程度かそれ以上の活性を持つことが知られている。有効性が確認されているということは、裏返せば同等の有害性も持っている事が考えられる。培養細胞の様な単一で単純な系では代謝産物がヒト体内と同様に産生されることは望めない。前年度では、親化合物である SA96 と、活性も血中濃度も低い SA672 を除く 2 種類の代謝物、SA981 と SA679 についてそれぞれ培養細胞へ曝露し、DNA マイクロアレイ

による遺伝子発現プロファイルの取得を試み、解析を行った。本年度は、得られた遺伝子プロファイルから、ブシラミンの細胞へ与える影響を推測し、検証を行った。

表 1 ブシラミン投与時の主な有害事象

Rash	2
Eruption	4
Proteinuria	5
Swollen lips	1
Vesicle	1
Nausea	1
Stomatitis	1

Mod Rheumatol(2008)609-614 より改編

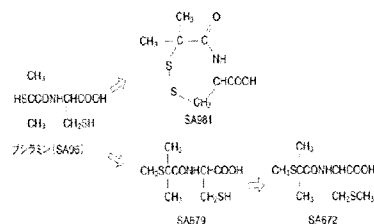


図 1 ブシラミンの推定代謝経路と代謝産物

B. 研究方法

1) 細胞活性及び細胞増殖能測定

薬物曝露による細胞活性への影響を、細胞内 ATP 量を測定することにより評価した。HEV0034 及び HEK293 細胞を 1×10^4 cells/well になる様に、96well 白色プレートへ撒いた。段階希釈した SA96、SA981、SA679 及び vehicle を含んだ培地をそれぞれ曝露し、最終 100 μ L 用量に調整し、72 時間、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。培養後、等量の「細胞の」ATP 試薬（東洋インク）を加えピペティングにてよく混ぜ、1 分間プレートをプレート震とう機で震とうした後、10 分間室温、暗所で放置、その後化学発光量を ARVOMax (PerkinElmer)にて測定した。

また、細胞の増殖能を、細胞数を数えることにより評価した。 5×10^5 cells/ml に調整した HEK293 細胞を 48well プレートに撒き、vehicle 及び SA96、SA981、SA679 それぞれ 100 μ g/mL を曝露した。対照としてアポトーシス誘導物質であるスタウロスポリンと HSP90 阻害剤で抗癌剤として開発中である 17-DMAG (いずれも SIGMA) をそれぞれ 1 μ M で曝露した。曝露した時間を Day0 とし、Day3 まで 24 時間毎に細胞数を測定した。測定時には 0.4%トリパンブルー (GIBCO) で染色し、トリパンブルー陰性の生細胞と陽性の死細胞をそれぞれ数えた。

2) シトクロム c 測定

各濃度の薬物で 24 時間曝露後、細胞を回収し、Human cytochrome c ELISA kit (Bender MedSystems)のプロトコールに従い、細胞内シトクロム c の量を測定した。陽性コントロールとしては 1 μ M スタウロスポリンを 9 時間曝露した細胞を用いた。検出には SPECTR MAX340 MAX340 (Molecular Devices) を使い、450nm

(reference wave length 650nm)にて測定を行った。

3) ミトコンドリア膜電位の観察

ミトコンドリアの膜電位の測定には JC-1 染色(Cayman Chemical Company)を行った。この JC-1 は正常なミトコンドリアには積極的に取り込まれ、dimer を形成して赤色の蛍光を発色する。膜電位が低下し、ミトコンドリア機能に障害が起きると細胞質内にとどまり、monomer のままで緑色の蛍光を発色する。この原理を利用し、形態を含めた観察には蛍光顕微鏡を用い、客観的な蛍光強度の測定には、マイクロプレートリーダーを用いた。まず、形態観察では、6well プレートもしくは 30mm dish に HEK293 細胞を $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/dish になる様に播種し、各薬物を曝露、24 時間培養を行った。一度室温の PBS で洗浄を行った後、JC-1 を 1/400、Hoechst33342 (LONZA) を 1/1,000 になる様に培地で希釈し、この培地を細胞に加えた。その後 30 分、37°C、5%CO₂ 雰囲気下でインキュベートを行った。染色終了後は、BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, Japan)にて、光学顕微鏡による細胞形態とともに、JC-1 及び Hoechst33342 の蛍光の観察を行った。蛍光強度測定においては、HEK293 細胞を 5×10^4 cells/well になる様に 96well プレートに播種し、各化合物を各濃度で曝露、24 時間培養を行った。培養終了後、JC-1 と Hoechst33342 を含む培地を等量加え、30 分、37°C、5%CO₂ 雰囲気下でインキュベートすることにより染色を行った。その後、JC-1 Assay buffer にて細胞を洗浄し、最終的に JC-1 Assay buffer を 100 μ L/well で加えて ARVOMax にて測定した。JC-1 monomer の緑色蛍光は励起波長 485nm、発光波長 535nm の条件で測定し、Hoechst33342 の測定には励起波長 350nm、発光波長 460nm の条件で測定した。蛍光強

度測定した後プレートを400xg、5分、室温で遠心し、上清を除去後、CellLytic™ MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (SIGMA)を100 μ L/well加え、細胞を溶解し、25 μ LをBCA™ protein Assay kit (Thermo SCIENTIFIC)を用いてタンパク質濃度を測定し、それにより蛍光測定値を補正した。

4) RT-PCR

HEK293細胞を12wellプレートに5x10⁵cells/wellになる様に播種し、各濃度になる様に薬物を曝露した。曝露24時間後に細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAはQuantiTect® Reverse Transcription kit (QIAGEN)を用いてcDNAを合成し、各遺伝子の3'末端側に設計したプライマーセット(TaKaRa)によりcDNAの増幅を試みた。増幅されたRNA量はGAPDHによって補正を行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により、コントロールと比較したときの各薬物曝露群における各遺伝子の発現量を比較した。

5) ウェスタンブロッティング

2x10⁶cells/wellになる様に6wellプレートに播種したHEK293細胞に各濃度になる様に調整した薬物を24時間曝露し、PBSで洗浄後、CellLytic™ MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagentにて細胞を溶解、回収した。凍結—融解を3回繰り返した後、超音波破碎機で10秒処理し、10,000 rpm、10分、4°Cで遠心した上清をサンプルとした。タンパク質の濃度測定はBCA法にて行い、総タンパク質量が10 μ gになるようにアクリルアミドゲル(NuPage, Invitrogen)にアプライし泳動した。常法に従い、ナイロンメンブレンに転写後、抗HSP90AB1及び抗HSP90B1(いずれもAVIVA Systems Biology)により検出を行

った。ノーマライズのために抗GAPDH (Open Biosystems)にてGAPDHを検出し、HSP90AB1/GAPDH比を比較し、タンパク質量の増減を解析した。

6) DNA ladder の検出

HEK293細胞を5x10⁶cells/wellになる様に、6wellプレートへ播種し、スタウロスポリン、17-DMAGは1 μ M、SA96、SA981、SA679は100 μ g/mL濃度で24時間、37°C、5%CO₂雰囲気下で培養・曝露を行った。24時間後、細胞をピペティングで回収し、1,500 rpm、5分、4°Cで遠心回収し、細胞沈殿を一度PBSで洗浄した。得られた細胞沈殿より、Apoptotic DNA Ladder Kit (Roche)を用いてDNAを回収し、1.5%アガロースにより電気泳動を行い、SYBR GreenI (Invitrogen)で染色後、DNA断片の確認を行った。

7) ヒストン ELISA

96wellプレートにHEK293細胞を4x10⁴cells/wellになる様に播種した。化合物の曝露濃度はDNA ladderの検出と同様に行った。曝露時間は24時間、48時間とし、その後Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)のプロトコールに従い細胞を処理し、培養上清と細胞分画内のヒストンの検出を行った。検出にはSPECTR MAX340を用い、405nm (reference wavelength 490nm)にて測定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトの検体や動物を用いておらず、遺伝子改変等の操作も行っていないため、倫理面は特に問題はなかった。

C. 研究結果

1) 細胞活性と細胞増殖への影響

細胞活性への影響を細胞内ATP量の測

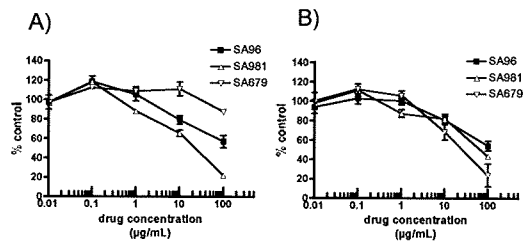


図2 BUCとその代謝物の細胞内ATP量に対する影響 (A)HEV0034 (B)HEK293 n=3で行い、mean±SEで表示。

定により比較検討を行った。HEV0034 に対しては、SA679では100 µg/mL以外ではほとんど影響がなかった。しかし、SA96とSA981では1 µg/mLから影響が見られ、10 µg/mL、100 µg/mLではSA679と比べ有意に低かった (図2A, $p < 0.01$)。SA981の方がより強くATP量に影響していた。HEK293細胞に対して同様に検討を行った結果、各化合物とも1 µg/mLより影響が見られる様になり、その後濃度依存的にATP量は減少することが解った (図2B)。以上より、HEK293細胞のATP量に対する影響はHEV0034とは異なっており、細胞種により影響が異なることが考えられた。

また、細胞の増殖性について検討を行った。化合物曝露後から1日毎に3日まで、0.4%トリパンブルー染色を行い生細胞の数をカウントした結果、ポジティブコントロールであるアポトーシス誘導薬スタウロsporin並びに、HSP90阻害剤である17-DMAGについては、2日目、3日目と細胞数の減少が見られた (図3A)。この減少は、vehicleと比べて有意であった ($p < 0.01$)。一方、SA96、SA981、SA679ではほぼvehicleと同様の変動が観察された。しかしいずれも有意な差ではないものの、vehicleよりは細胞数が少ない傾向が見られた。3日目における細胞数を比較したところ、SA679以外vehicleと比較して有意に細胞数が少なか

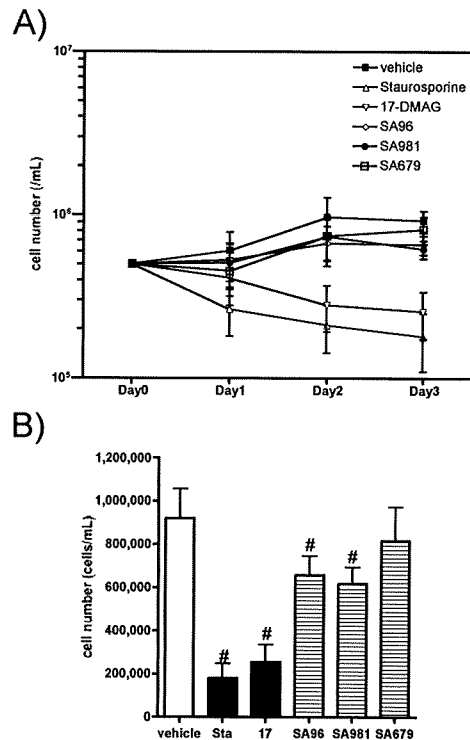


図3 BUCとその代謝物を曝露したときのHEK293細胞数の変化 (A)曝露後3日までの経時的変化 (B)曝露後3日における生細胞数 Staurosporineと17-DMAGは1 µM、SA96、SA981、SA679は100 µg/mLで曝露した。

った (図3B)。SA679もvehicleと比べると有意ではないが減少傾向にあった。

2) シトクロムcの放出

ミトコンドリアへのストレスの有無を確認するため、細胞内のシトクロムcの定量を行った。陽性コントロールとしては1 µMのスタウロsporinをBUC並びに活性代謝物と同様に曝露し比較した。その結果、SA96、SA981、SA679いずれの化合物でも0.01 µg/mLの低濃度から有意にシトクロムcの量が増えており、化合物曝露24時間でミトコンドリアに何らかのストレスがかかっていることが明らかになった (図4)。

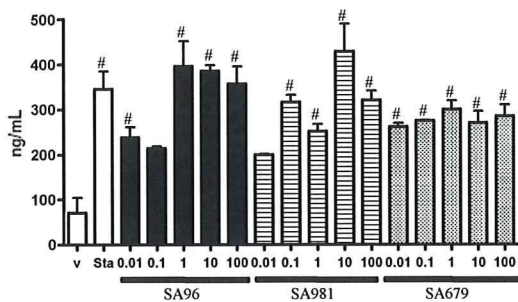


図4 BUC及びその代謝物を24時間曝露した時のHEK293細胞内のシトクロムc量
v; vehicle, Sta; 1 μ M staurosporine
mean \pm SE, n = 3, #: p < 0.01 vs vehicle

3) ミトコンドリア膜電位

シトクロムcの放出と共に、ミトコンドリア膜に孔が開き、Ca²⁺やH⁺の流出の結果、膜電位の低下が起こり、ミトコンドリアの機能は損なわれる。そこで各化合物を曝露したHEK293細胞をJC-1及びHoechst33342によって二重染色し、蛍光顕微鏡で形態とともに観察を行った。その結果、未処理のcontrol細胞では緑色の蛍光はほとんど観察されず、赤色蛍光のみが観察された(図5)。またHoechst33342では一様に核が染まっている様子が観察された。

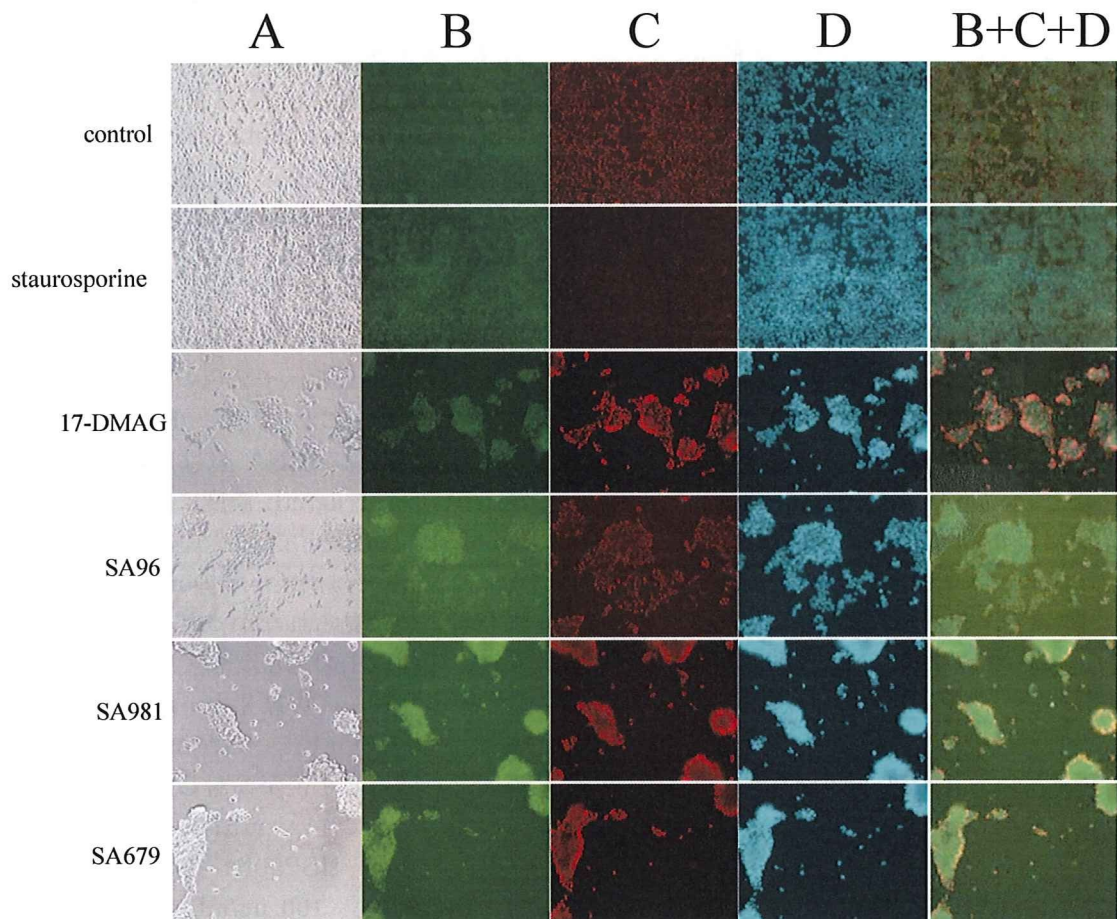


図5 各化合物に24時間曝露した後の細胞の様子 A)細胞の位相差像 B)JC-1染色、FITCフィルター C)JC-1染色、DsREDフィルター D)Hoechst33342染色
B+C+Dの重ね合わせ像は蛍光顕微鏡のオペレーションソフトにより行った。

また、アポトーシス障害を起こすコントロールとしてスタウロスポリンと 17-DMAG に曝露した細胞の様子を観察したところ、スタウロスポリンでは赤色蛍光は全く観察されなかったのに対し、17-DMAG では緑色と共に赤色も観察され、スタウロスポリンとは若干様相が異なった。しかし、Hoechst33342 の蛍光強度は control に比べ強く思われ、核内が断片化し、小包が形成されている様子も観察された。一方 SA96、SA981、SA679 でも緑色蛍光が観察されたが、17-DMAG 同様に赤色蛍光も観察された。Hoechst33342 の蛍光強度は control と比べ強くなっている様に思われた。細胞形態については、スタウロスポリンでは細胞が丸く小さくなっているのが観察されたが、SA96、SA981、SA679 では細胞の大きな集団（塊）が出来ており、重なっている様子が観察された。プレートリーダーで蛍光強度を測定し、タンパク質量濃度で補正した結果、JC-1 の緑色蛍光はスタウロスポリンでは control の 10 倍以上になっていた（図 6A）。17-DMAG でも約 5 倍程度増強していた。SA96、SA981、SA679 の各化合物でも蛍光強度の増強は見られたが、スタウロスポリンや 17-DMAG と比較すると弱く、control と比較すると約 2 倍前後の増強であった。しかし、曝露濃度によっては control と比べ、 $p < 0.01$ と有意差を持って増強していた。

Hoechst33342 の蛍光強度も同様に測定し比較した所、control と比べ、有意差があった処理群は JC-1 とほぼ同じであった（図 6B）。このことは、細胞障害とミトコンドリア障害は相関していることを示していると考えられる。

4) 遺伝子発現量の測定

BUC により遺伝子発現が上昇したミトコンドリア、エネルギー代謝関連遺伝子群の中で、複数プローブが候補にあがった

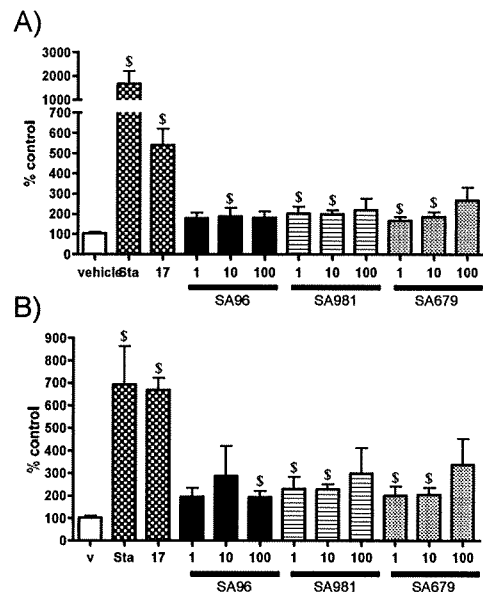


図 6 蛍光強度のマイクロプレートリーダーでの測定結果 A) JC-1 の緑色蛍光の測定結果 B)Hoechst33342 の測定結果 両結果とも、well 内のタンパク質量により補正した。Results shows mean±SE, n = 3, \$; $p < 0.05$ v.s. vehicle

HSP90B1 と HSP90AB1 について、RT-PCR による遺伝子発現の定量を行った。24 時間後においては、HSP90B1 と HSP90AB1 の mRNA 量は SA981 及び SA679 では 1 $\mu\text{g/mL}$ 濃度において有意に vehicle よりも増えていた（図 7A, B）。しかし、SA96 では両遺伝子の mRNA で有意な発現増加は見られなかった。これらの結果は、2 倍以上の発現変動で絞り込んだ時のマイクロアレイの結果と一致している。また、これらの mRNA が薬物濃度により発現変化を受けるか否か検討したところ、濃度が高くなるに従い、mRNA は減少する傾向がみられた。HSP90B1 では、SA981 では 10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ ではいずれも vehicle と比較すると有意に mRNA 量は多いが、1 $\mu\text{g/mL}$ の時と比較すると減少していた。また SA679 では 100 $\mu\text{g/mL}$ では有意な差では無くなっていた。HSP90AB1 に

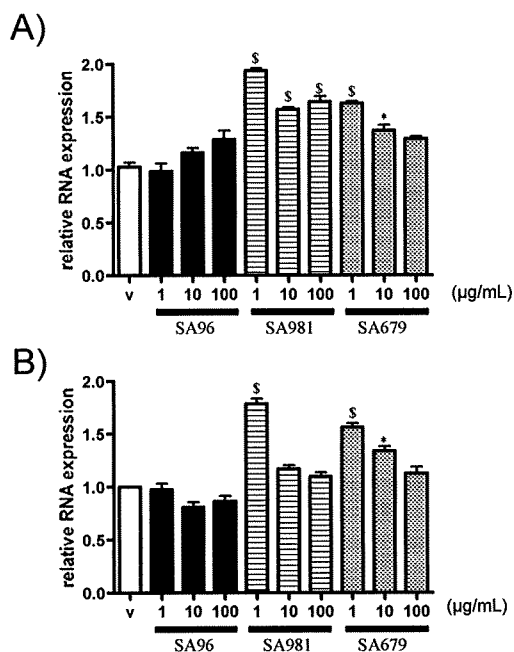


図 7 濃度別に 24 時間曝露した後の mRNA の RT-PCR 結果 A) hsp90b1 B)hsp90ab1、v = vehicle, n = 3, mean±SE #; p < 0.05, *; p < 0.1, \$; P < 0.001 v.s. vehicle

関しては、SA981 では 10 µg/mL、100 µg/mL いずれにおいても vehicle と比較すると有意な差は無く、SA679 では 10µg/mL では有意に mRNA 量は多いものの、100µg/mL では有意では無くなっていた。また、同様に処理した別の細胞からタンパク質を調整し、ウェスタンブロッティングによりタンパク質の発現を比較したところ、統計学的には有意な差は得られなかったが、mRNA と同様の傾向が見られた (図 8A、B)。特に SA679 では曝露濃度が高くなると HSP90AB1 で量が少なくなる現象は再現良く観察された。

5) DNA ladder の検出

それぞれの化合物で 24 時間処理した後、DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動により DNA の断片化が見られるか否か検討

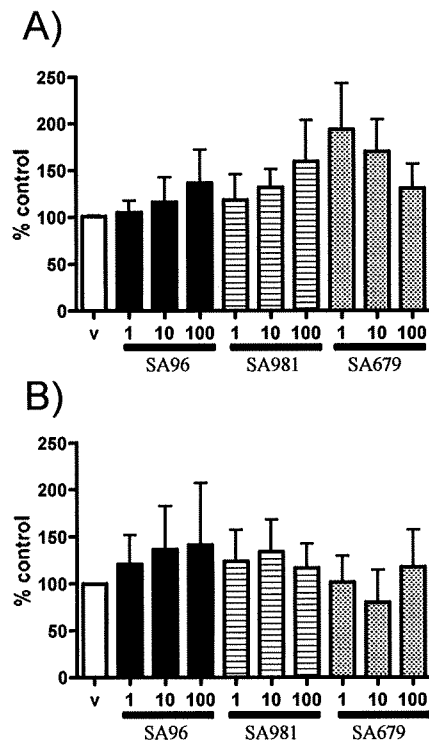


図 8 各濃度で 24 時間曝露した時のタンパク質量の変化 A) HSP90B1 B) HSP90AB1

した。低分子量領域 (300-500bp 付近) で、SA96、SA981、SA679 で処理した群でバンドが増える傾向を認めたが、その他には vehicle との違いを見出すことは出来なかった (図 9)。

6) ヒストン断片化の高感度検出

高感度であること、そして数値として客観的に量的比較が出来るという点を考慮して、アポトーシスとネクローシスの区別が可能なヒストン断片の ELISA 検出を試みた。アポトーシスの陽性コントロールであるスタウロスポリンでは 24 時間 48 時間いずれにおいても vehicle と比較して、アポトーシスを有意に検出することが出来た (図 10A、B)。また、スタウロスポリン処理細胞集団内でも、アポトーシスがネクローシスに比べ有意に高かった。これと比較し、

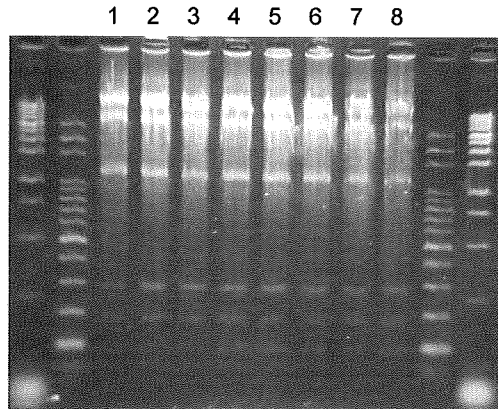


図 9 各化合物に曝露 24 時間 (スタウロスポリン及び Fas-L は 9 時間) に曝露した後の細胞から回収した DNA のアガロースゲル電気泳動図 lane1) 未処理 lane2) vehicle lane3) 1 μ M スタウロスポリン lane4) 20ng/mL Fas-L lane5) 1 μ M 17-DMAG lane6) SA96 100 μ g/mL lane7) SA981 100 μ g/mL lane8) SA679 100 μ g/mL

SA96、SA981、SA679 では、24 時間では vehicle と比較して全く変化は無かった。48 時間になると、vehicle と比較して、僅かではあるが有意に SA96 と SA981 でネクロシスが高くなり、SA679 では有意にアポトーシスが高かった。また、SA96 に関しては、アポトーシスと比較してネクロシスの方が有意に高いという結果が得られた。

D. 考察

BUC 投与による蛋白尿を伴う腎障害は、投薬を中止すれば回復するので、重篤ではない。しかし、最近の報告ではその発生率は 10-20%程度となり、頻度が高いが、中止による投薬経緯各の変更をしなければならず、また腎機能回復の期間が推測出来ない。この様な BUC による腎障害のメカニズムを明らかにすることは、尿検査等の無駄な検査が無くなり、治療への負担を軽減させるためにも有効である。そこで今回、ヒト

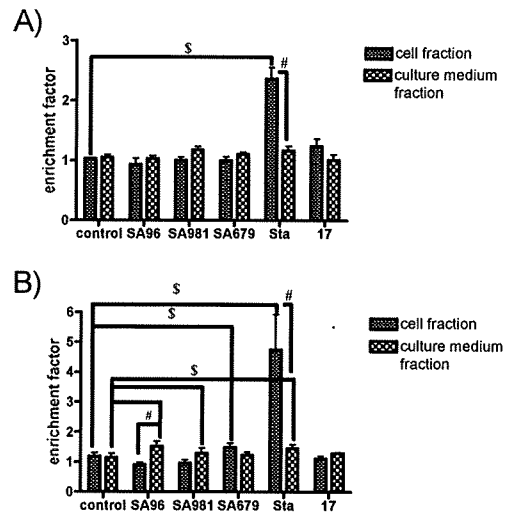


図 10 各化合物に曝露した後 24 時間(A) と 48 時間(B)の細胞内と培養上清のヒストン量の ELISA 測定結果 Sta; 1 μ M スタウロスポリン, 17; 1 μ M 17-DMAG, SA96, SA981, SA679 は各 100 μ g/mL

胎児腎由来細胞 HEK293 に BUC を曝露し、そのトランスクリプトームの解析を行った。その結果、非常に多くの発現変化を検出することが出来たが、その中で特にミトコンドリア関連の遺伝子に注目をした。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー生産・呼吸を司る重要な細胞内小器官であり、肝臓における薬物障害のターゲットの一つでもある。また、カドミウムや水銀、鉛等の重金属類による腎障害には、酸化ストレスによる障害が出ることは良く知られている。特に酸化ストレスによるミトコンドリア障害は良く知られているところであり、ROS の発生により、Bax と Bid によるミトコンドリア孔の増大とシトクロム c の流出、Ca²⁺に流入による細胞の膨張等により、細胞を死に至らすこととなる。BUC のトランスクリプトーム解析より、ミトコンドリア機能への BUC の関与が疑われたが、BUC 自体には酸化能はなく、むしろ抗酸化剤と

しての機能がクローズアップされている。本研究において、念のため BUC による細胞内のスーパーオキシドの発生の有無を検討したが、スーパーオキシドは確認されず、むしろ濃度異存的にスーパーオキシドの現象が観察された（データ示さず）。そこで、実際 BUC の曝露によりミトコンドリアにどのような影響があるのか、シトクロム c の測定とミトコンドリア膜電位の観察により確認した。

そうしたところ、BUC の曝露により、かなりの低濃度でシトクロム c の放出量が増えており、また、ミトコンドリアの膜電位の低下も有意に起こった。これらの結果より、ROS 以外のストレスによってミトコンドリア機能が低下していることが考えられた。シトクロム c の放出が行われると、シトクロム c と Apaf-1 と呼ばれるタンパク質が結合し、アポトソームという複合体を形成する。このアポトソームとカスパーゼ 9 前駆体が結合して活性型カスパーゼ 9 がとなり、最終的な実行分子であるカスパーゼ 3 が活性化する。しかし、BUC の曝露ではカスパーゼ 9 及び 3 の活性化は起こらず、むしろ低下させていることが解った（データ示さず）。実際に、曝露 24 時間ではアポトーシスに特徴的な DNA の断片化は観察されず（図 9）、ヒストンの検出においても、細胞内における断片化量はコントロール細胞と比べて大きく変化は無かった。これらのことから BUC 曝露後 24 時間ではなんらかのストレスがミトコンドリアにかかっていることは確かだが、細胞死を進める程ではないと推測されるが、細胞死を緩やかにするような因子が働いている、とも考えられる。

細胞死のもう一つの形態としてネクローシスが良く知られているが、一昔前までは、受動的な現象であり遺伝子の積極的な関与は無いと考えられていた。しかし、最近ではアポトーシス同様に遺伝子カスケードに

より制御されている「計画的細胞死」であるという説も見られる。ネクローシスでも一部アポトーシスとシグナルカスケードを共有していることがあり、アポトーシス同様にミトコンドリアにストレスがかかり、孔の拡大と膜電位の低下、シトクロム c の放出も観察される場合がある。この時の二つの細胞死を分ける最大の違いは、細胞内の ATP 量であり、アポトーシスでは ATP が豊富に存在する下で行われ、この ATP が枯渇するとネクローシスという現象に分かれる。BUC の曝露により、Hoechst33342 の発光量の増加、ミトコンドリアの膜電位低下、シトクロム c の放出等が観察され、アポトーシスかネクローシスを起こしていることが推測された。しかしながら、DNA の断片化は起こっておらず、断片化ヒストンの量を測定したところ、24 時間では vehicle と差は無く、48 時間になって僅かにネクローシスが有意になっていた。ATP の相対量と細胞数との比較を行ったところ、曝露 1 日めで既に細胞数は vehicle と比較して少なくなる傾向にあり、3 日めでは、細胞数は SA96、SA981、SA679 全ての群で有意に vehicle より少なくなった。細胞数と ATP の量は比例していると考えられ、ATP 量の減少は細胞数の減少と考えられる。しかし、細胞内の ATP 量が一定であると仮定すると、細胞数はコントロールに比べその減少が 68-88% 程度であるのに対し、ATP の減少量は約 60% 以下となる（図 2、3）。このことより、細胞数の減少率に比べ ATP の減少量が大きいことから、BUC とその活性代謝物を曝露した細胞内では、ATP の枯渇現象が起こり、ネクローシス経路へと傾いているのではないかと推測することも出来る。しかし、一方で ATP の減少による細胞成長の抑制や、細胞周期障害による ATP の産生能低下、等の原因も考えられるため、今後さらなる詳細な検討が必要かと思われる。

今回トランスクリプトーム解析とその validation により、HSP90 の 2 つのアイソフォームが BUC により発現誘導されることが確認された。HSP90 はヒートショックプロテインファミリーの一つであり、分子シャペロンとして機能している。様々なタンパク質が HSP90 のクライアントとして報告されており、その中にはアポトソームの構成タンパク質で、カスパーゼ 9 の活性化に必須である Apaf-1 も含まれている。HSP90 と Apaf-1 の複合体が形成されることにより、カスパーゼ 9 の活性化が出来ず、結果カスパーゼ 3 が活性化されずにアポトーシスが抑制されることが報告されている。また、それ以外にも Akt と HSP27 と複合体を作ることにより Bad をリン酸化し、ミトコンドリアの Bax 孔の形成を阻害することも報告されている (Beere 2005)。一方で、低酸素誘導性遺伝子の一つで、ミトコンドリアを介したアポトーシスに関与する HGTD-P(FAM162A)タンパク質の、ミトコンドリア移送にこの HSP90 が関与し、アポトーシスを増強するという報告もある。今回、この時のクライアントタンパク質となる HGTD-P の有意な発現上昇はマイクロアレイデータでは確認出来ておらず、このシステムが機能しているか否かは定かではない。現在得られている証拠としては、ミトコンドリアの膜電位の低下が観察され、シトクロム c の放出も増加しており、ATP の減少と細胞数の減少が観察されている。シトクロム c の放出は増加しているが、カスパーゼ 9 及びカスパーゼ 3 の活性化は起こっていない。このことは、アポトソームの形成の阻害には HSP90 が働いていると考えられる。今回 validation は取れていないが、BUC により発現が上昇した遺伝子リスト (表 2) の中には HSP70 のアイソタイプが含まれており、この HSP70 は HSP90 のさらに下流でアポトソームと前駆体カスパーゼ 9 の結合を阻害する。よ

って、2 重にシトクロム c 以下のカスケードを抑制しており、急激な細胞死を抑制している可能性が考えられる。しかし現在のところ、ATP の減少による細胞の増殖抑制が起こり、通常の細胞よりも成長スピードが遅くなっている、と考えるのが妥当だと思われる。BUC が細胞増殖 (成長) に与える影響については、BrdU やチミジンを用いた、DNA 合成能の比較や、サイクリンの測定等、より詳細な検討が必要である。

E. 結論

細胞に対する影響は SA96、SA981、SA679 はそれぞれ細胞 ATP を減少させるが、その影響は化合物により違うことが解った。これと共に、細胞増殖抑制が観察された。トランスクリプトーム解析の結果より、ミトコンドリア機能への影響が疑われ、シトクロム c 量の増大やミトコンドリア膜電位低下が観察された。また、核への影響も若干疑われた。HSP90 の 2 つのアイソフォーム B1 と AB1 の mRNA レベルが増加しており、タンパク質も有意ではないが増加傾向にあった。細胞への影響がこれら 2 つの分子の増加と相関していること、しかしながら細胞死に代表される様な顕著な細胞障害像が観察されないことから、これら 2 つの分子は、分子シャペロンとして主に細胞の防御機構の一部を担っており、急激な細胞死から見かけ上、細胞成長抑制にとどめていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 津田英利・興水崇鏡・安藤仁・藤村昭夫. 抗リウマチ薬ブシラミンのトキシコ

ゲノミクス研究—in vitro における検討—
Toxicogenomics in vitro study of
bucillamine, an anti rheumatoid arthritis
第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12
月 9 日-12 日 横浜 パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

薬剤性肝障害を早期に検出するための安全性バイオマーカーの開発

研究分担者 興水崇鏡 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 准教授
研究協力者 土屋裕義 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 助教

研究要旨

現在臨床で使用されている薬剤の有害作用は、治療薬の効果に直接悪影響を及ぼすことより、早期検出、作用機序の解明、対策方法の確立などが早急に求められている。また、患者個々人の薬剤副作用発現を事前にスクリーニングできるマーカー開発することは、最適な治療を選択するために必須となっている。薬剤性肝障害は高頻度に起こることが知られる薬物有害作用の一つで、薬物治療上問題になることからその対策が求められている。申請者らは今回、動物による薬剤性肝障害モデルの作用機序に関する知見より、肝機能の異常と糖代謝の異常を急激に促進させる可能性を示唆する結果を得たので報告する。この結果を糖代謝異常を背景に持つ患者群に応用することにより、薬物有害作用の軽減につながることを期待される。

A. 研究目的

薬剤性肝障害は様々な薬物治療時に問題となる副作用の一つであり、肝障害発現により休薬あるいは中止が余儀なくされ治療の幅を狭める原因となっている。現在、薬剤性肝障害の診断基準として細胞障害型のASTやALT、胆汁鬱滞型と混合型のALPが広く使われている。しかしながら、実際に肝障害発現の作用機序が解明されている薬物は非常に少なく、どのような因子がかかわっているか不明である。そこで、本研究ではより薬物特異的あるいは感度の高い肝障害検出のバイオマーカーとなるべき因子の探索、ならびにその有害作用メカニズムとの関連性に注目して解析を進める。

子宮収縮抑制薬リトドリンは特に臨床上問題となる重篤な肝障害の発症があり得ることが知られている。肝障害の発生により母体だけでなく胎児に対しても悪影響を与える可能性があることから、保険行政上も留意すべき事例であると考え。以上のことから本研究ではこのリトドリンによる薬剤性肝障害に注目し、その予測法の確立・バイオマーカーの同定と作用機序の解明を目的に進める。

B. 研究方法

・長期投与

8-10 週雌性 C57/BL6J マウスを1週間順化飼育後、200 mg/kg のリトドリン、または生理食塩水を連日14日間腹腔内投与し、経過中の体重、食餌量、飲水量をモニターした。最終投与24時間後に肝組織、脂肪組織と血清を採取し組織学的解析、トランスクリプトーム解析、生化学検査を行なった。DNA マイクロアレイで得られた結果はDAVID プログラムを用いて遺伝子オントロジーごとにクラス分けを行い、寄与度が高い順に順位付けを行った。また、24時間の絶食後に30 mg/kg のリトドリンまたは生理食塩水を腹腔内投与し、1.25g/kg のグルコース負荷を行い、その後の血糖変化を記録した。

・単回投与

長期投与と同様にリトドリン投与、ならびに1.25g/kg のグルコース負荷を行い、その後の血糖変化を記録した。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の動物実験委員会の承認を得て実施し、動物愛護の観点から苦痛を最小限に止める様配慮した。ヒト試料は取り扱っていない。

C. 研究結果

1) 肝臓トランスクリプトーム解析

—DAVID プログラムを用いた解析—

Affymetrix 社 Genechip Mouse Genome 430

2.0 アレイを用いて生食投与群とリトドリン 200 mg/kg 投与群を比較した。その結果、2 倍以上の発現上昇もしくは発現低下が見られた遺伝子をそのオントロジーに従って順位付けをしたところ、発現上昇した群も発現低下をした群も脂質・ステロイド代謝にかかわる過程の遺伝子が顕著に変化していることが明らかになった (図 1, 2)。

図1. 発現上昇した遺伝子の寄与の大きな遺伝子オントロジー

Increase GO Involved in lipid and cholesterol

Term	Count	%	P-Value
cellular lipid metabolic process	25	7.5	2.70E-06
lipid metabolic process	26	7.8	9.80E-06
metabolic process	148	44.2	1.50E-05
electron transport	20	6	4.60E-05
cofactor metabolic process	13	3.9	1.00E-04
generation of precursor metabolites and energy	22	6.6	1.00E-04
lipid transport	8	2.4	3.30E-04
carboxylic acid metabolic process	19	5.7	4.20E-04
coenzyme metabolic process	11	3.3	4.20E-04
organic acid metabolic process	19	5.7	4.30E-04
monocarboxylic acid metabolic process	12	3.6	5.00E-04
alcohol metabolic process	13	3.9	8.60E-04
cellular metabolic process	128	38.2	1.20E-03
water-soluble vitamin biosynthetic process	4	1.2	2.40E-03
intracellular signaling cascade	31	9.3	2.60E-03
fatty acid metabolic process	9	2.7	3.30E-03
vitamin biosynthetic process	4	1.2	3.30E-03
lipid biosynthetic process	11	3.3	4.20E-03
biological regulation	86	25.7	4.90E-03
regulation of small GTPase mediated signal transduct	9	2.7	5.10E-03

図2. 発現低下した遺伝子の寄与の大きな遺伝子オントロジー

Decrease GO Involved in lipid and cholesterol

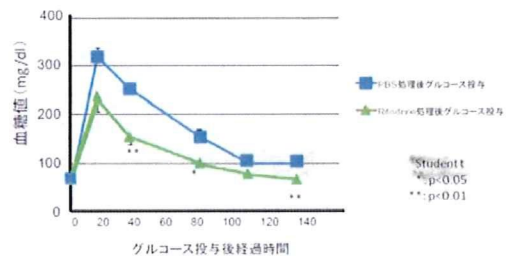
Term	Count	%	P-Value
sterol biosynthetic process	11	2.2	6.70E-10
cholesterol biosynthetic process	10	2	1.00E-09
alcohol metabolic process	25	5.1	1.50E-08
steroid biosynthetic process	13	2.7	5.70E-08
biosynthetic process	60	12.3	9.30E-08
isoprenoid biosynthetic process	8	1.6	9.30E-08
metabolic process	224	45.8	9.60E-08
sterol metabolic process	13	2.7	1.10E-07
steroid metabolic process	17	3.5	3.10E-07
cholesterol metabolic process	12	2.5	3.30E-07
isoprenoid metabolic process	9	1.8	8.80E-07
lipid metabolic process	36	7.4	1.10E-06
cellular lipid metabolic process	31	6.3	8.80E-06
lipid biosynthetic process	19	3.9	1.50E-05
apoptosis	33	6.7	5.10E-05
cell death	34	7	6.10E-05
death	34	7	6.40E-05
primary metabolic process	194	39.7	6.50E-05
programmed cell death	33	6.7	7.10E-05
cellular metabolic process	192	39.3	1.60E-04

2) リトドリン投与による血糖値への影響

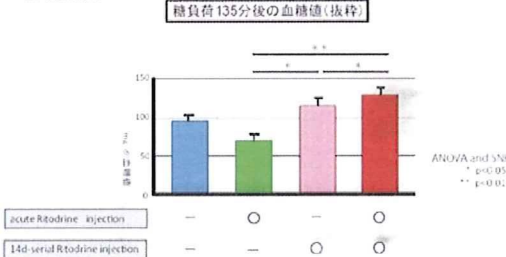
リトドリンの単回投与後グルコース負荷を行い、血糖値変化を時間を追って追跡したところ、リトドリン 30 mg/kg 群では血糖値の上昇が生食投与群に比べて有意に抑えられた (図 3 参照)。

図3. リトドリン投与後のグルコース負荷試験

1. 単回投与



2. 連続投与



また投与 2 週間後に同様な実験を行ったところ、生食の 2 週間連続投与では単回投与と同様にリトドリン投与後のグルコース負荷で血糖値の有意な低下が観察されたが、リトドリン 200 mg/kg の連続投与ではこうした変化は観察されなかった。

D. 考察

子宮収縮抑制薬リトドリンは臨床的に重篤な肝障害の発症が知られているが、その特異的なマーカーならびに作用機序の詳細は明らかとなっていない。本研究のトランスクリプトーム解析により個々の遺伝子の発現変化だけではなく、ある特定の機能に関連した遺伝子群が総体として発現変動していることが示された。特にこれらの遺伝子群には脂質やステロイドの代謝に関与するものが多く含まれることが明らかとなった。

また、リトドリンの単回投与では糖に対する影響が見られ、糖負荷後の血糖値上昇を抑制する効果を見せたが、この効果は 2 週間の連続投与では観察されなかった。

以上より、リトドリンを長期投与することにより肝臓中で遺伝子の発現変化が誘導され、肝機能が変化することで肝臓に対する有害作用が引き起こされる可能性が示唆

された。また、そうした機能に関する遺伝子の生来持つ多様性が個人の副作用発現差異として表れることが推察される。

実際にリトドリンはβアドレナリン受容体を介してその作用を発揮することが知られているが、βアドレナリン受容体は肝細胞において糖や脂質の代謝に関与することが知られている。今回の我々の知見から、さらに関与する因子をバイオマーカーとして同定することは、副作用発現を事前に検出することにつながる有用なツールであると考える。

E. 結論

薬剤性肝障害を誘導するような薬物負荷時に肝臓では糖や脂質の代謝に関連する機能で変化が起きていることが観察された。今後これらの遺伝子候補をさらに絞り込むことによって、臨床にも用いることのできるバイオマーカーの確立を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshimizu, T., Tsuchiya, H., Tsuda, H., Fujiwara, Y., Shibata, K., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., and Fujimura, A., Inhibition of heat shock protein 90 attenuates adenylylase cyclase sensitization after chronic morphine treatment. **Biochem Biophys Res Commun**, in press. (2010).
2. Koshimizu, T., Fujiwara, Y., Sakai, N., Shibata, K., and Tsuchiya, H., Oxytocin stimulates expression of a noncoding RNA tumor marker in a human neuroblastoma cell line. **Life Sci**, in press. (2010).
3. Ushijima, K., Tsuruoka, S., Tsuda, H., Hasegawa, G., Obi, Y., Kaneda, T., Takahashi, M., Maekawa, T., Sasaki, T., Koshimizu, T., and Fujimura, A., Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism

by human liver microsomes, but not in healthy human subjects. **Br J Clin Pharmacol**, 68(2): p. 194-200. (2009).

4. Stojilkovic, S.S., He, M.L., Koshimizu, T., Balik, A., and Zemkova, H., Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland. **Mol Cell Endocrinol**. (2009).
5. Koshimizu, T. and Tsujimoto, G., New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception. **J Pharmacol Sci**, 109(1): p. 33-7. (2009).
6. Kojima, Y., Sasaki, S., Oda, N., Koshimizu, T., Hayashi, Y., Kuniwa, M., Tsujimoto, G., and Kohri, K., Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. **Prostate**, 69(14): p. 1521-8. (2009).
7. Hara, T., Hirasawa, A., Sun, Q., Sadakane, K., Itsubo, C., Iga, T., Adachi, T., Koshimizu, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., and Tsujimoto, G., Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 380(3): p. 247-55. (2009).

2. 学会発表

1. β2 作動薬 Ritodrine 刺激後の肝臓での網羅的遺伝子発現解析
土屋裕義、津田英利、藤村昭夫、奥水崇鏡 第19回日本循環薬理学会 京都 2009年11月

G. 知的財産権の出願

1. 特許申請準備 1件
学内審査；名称 新規創薬バイオマーカーの発見。発明者；奥水崇鏡、土屋裕義、山田俊幸、藤村昭夫

薬剤性腎障害に対する早期発見可能なバイオマーカーの開発

研究分担者 興水崇鏡 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 准教授
研究協力者 藤原葉子 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 研究員

研究要旨

薬物による有害作用の早期発見は、的確な段階で最適な治療薬を選択することができ、安全性の高い医療を提供することへと繋がる。患者個々に対する肉体的、時間的、経済的等様々な負担を軽減させる観点から、薬剤性腎障害には特に早期発見が必要とされる。これまで、種差により齧歯類での薬剤性腎障害誘発が困難であり、薬害発症の有効な解析手段が得られなかった。本研究で、申請者らは薬剤性腎障害モデル動物の作成に成功した。当動物モデルの解析は薬剤性腎障害の解析、且つ臨床応用可能なバイオマーカー選出に際し有用であると考えられる。

A. 研究目的

薬物性腎障害のうち、糸球体障害を誘発する薬物はいくつか報告されているが、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARDs）もその一つである。現在、腎機能異常の判断は主に蛋白尿を指標としており、DMARDs使用者の約10%の頻度で薬物性腎障害が現れ、蛋白尿が出現する。腎障害発症を最低限に抑えるためには、尿所見異常に注意しながら投薬を続ける必要がある。しかしながら、蛋白尿には自覚症状がなく、発見の遅れは病状を悪化させ、腎障害に対する治療を長引かせる原因となる。したがって、副作用のリスクを回避すると同時に、個々に効果的なリウマチ治療薬を選択するには、薬物性糸球体腎障害を予測、あるいは早期発見することのできる有効な手段が必要とされる。

バイオマーカー候補のプロファイリングには動物モデルが有用であると考えられる。本研究では、これまで報告例のないDMARDsによる糸球体腎障害モデル動物を新たに作成することから着手し、薬剤性腎糸球体障害を予測するバイオマーカーの同定を試みる。

B. 研究方法

6週齢の雄BALB/cマウスを一週間飼育室で順化させ、片腎摘除を行った。一週間回復させた後、腎糸球体障害が報告されているDMARDsを2種類選択し（それぞれ薬物A、および薬物B）、1000 mg/kgと2000 mg/kgの薬物A、そして2000 mg/kgの薬物Bを毎日経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロースを投与した。投与終了までの4週間、毎週蛋白尿の測定を行って経過を観察した。投与終了後、採血と腎臓を採取し、組織学的解析、血液生化学検査を行った。本研究は学内の動物実験指針に基づいて実施し、動物愛護の観点から苦痛を最小限に止める様配慮した。

C. 研究結果

1)尿所見および血液生化学検査

薬物A投与群では、いずれの濃度でも投与開始後1週目より対照群よりも有意な尿中蛋白質の上昇が見られた（図1）。血液生化学検査の結果、両濃度とも薬物A投与群では血清中総蛋白、アルブミンが低下しており、クレアチニンクリアランス（Ccr）は低下傾向であった。血清中BUN値、クレアチニン値に有意な変化はなかった。一方、薬物B投与群では蛋白尿、血液生化学パラメータいずれも対照群と比べて有意な差は見られなかった。

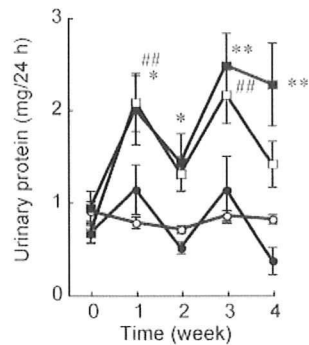


図1.薬物投与による蛋白尿の出現
薬物 A 投与群で蛋白尿が出現した。○；対照群、
■；薬物 A 1000 mg/kg 群、□；薬物 A 2000 mg/kg
群、●；薬物 B 2000 mg/kg 群。同週の対照群に対
し、* P<0.05, ** P<0.01 (薬物 A 1000 mg/kg 群)、
P<0.01 (薬物 A 2000 mg/kg 群) を示す。

2)腎組織学的解析

腎臓のPASおよびPAM染色を行ったが、顕微鏡上では糸球体基底膜の肥厚やスパイクなどの異常は見られなかった。DMARDsによる腎糸球体異常の特徴として、糸球体に免疫複合体の沈着が見られるため、蛍光免疫組織染色を行ったところ薬物 A 2000 mg/kg 群で強いIgG陽性反応が見られ、次いでIgAの沈着が確認された(図2)。薬物 B 群では、同濃度の薬物 A 群よりも弱いIgGの沈着が見られ、IgA陽性反応は見られないか、あっても僅かであった。いずれの薬物処理群でも、補体 C3 の沈着は非常に少なかった(図2)。

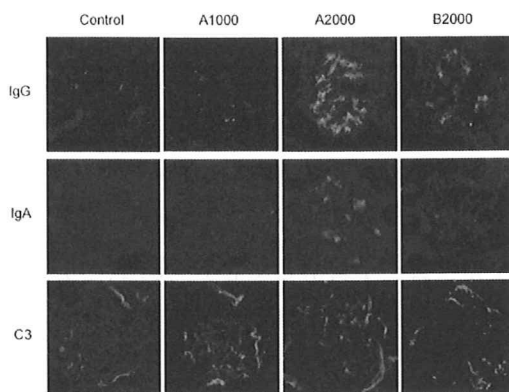


図2.腎糸球体に対する免疫複合体の沈着
薬物 A 2000 mg/kg 群で最も強い免疫複合体の免疫
陽性反応が見られた。A、B はそれぞれ薬物 A 群、
B 群を示し、数字は投与濃度 (mg/kg) を示す。

D. 考察

これまで、DMARDsによる糸球体腎障害を示すモデル動物の作成は困難であり、ヒトと齧歯類では腎機能への影響に種差があることが推定されたが、本研究において薬物性腎障害マウスの作成に成功した。このマウスはネフローゼ様症状を示し、Ccr 低下傾向であることから、糸球体障害を来していると予測され、薬剤性糸球体障害の解析に有用であると考えられる。

蛋白尿が出現した薬物 A 群のうち、低濃度投与でも十分な効果が見られた。ヒトでは、薬物 A の一日最大容量は 300 mg であり、LD₅₀ はマウス傾向投与の例で 4500 ~ 4600 mg/kg と報告されている。本実験では治療域以上の比較的高い濃度を用いており、今後、これらモデル動物の腎あるいは血液を用いた遺伝子発現プロファイニングと同時に、より低濃度、且つ長期投与などの実験から糸球体障害とバイオマーカーの追跡を行うことが課題となる。

同じ DMARDs の類でも、薬物 A と B とでは、蛋白尿の出現や糸球体への IgG 沈着程度に違いが見られた。薬物 A は薬物 B よりも免疫抑制作用が強く、抗リウマチ作用が優れているという報告があることから、その差が各所に影響したのではないと思われる。本研究の結果において、薬物 B 群では蛋白尿、その他腎障害を示す所見は得られなかったが、糸球体への IgG の沈着は観察されたことから、薬物 B 群では病状を把握できない段階にあることも推定される。したがって、両モデルともバイオマーカーの挙動を調べる上で有用であると考えられる。

E. 結論

本研究により DMARDs による腎障害モデル動物の作成に成功した。本研究をさらに展開し、臨床応用可能な薬剤性腎障害バイオマーカーの同定と、蛋白尿発症メカニズムを探求する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyagi, T., Koshimizu, T., and Tanoue, A., Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. **Kidney Int**, 76(10): p. 1035-9. (2009).

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

資料 1

別記様式第 3 号 (第 8 条関係)

遺伝子解析研究許可決定通知書

平成 20 年 7 月 15 日

申請者 (研究責任者)
薬理学講座臨床薬理学部門
安藤 仁 殿

自治医科大学
学長 高 久 史 磨



受付番号：第 遺 0 8 - 0 6 号

課題等名

末梢血遺伝子発現解析を用いた薬物安全性バイオマーカーの検索

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	承認	条件付承認	変更の勧告	不承認	中止	その他
理由、条件、勧告又は意見						

別記様式第4号（第15条関係）

遺伝子解析研究変更許可申請書

平成21年 4月 14日

自治医科大学学長 殿

申請者（研究責任者）

所 属 薬理学講座臨床薬理学部門

職 名 准教授

氏 名 安藤 仁

所属長

職 名 教授

氏 名 藤村昭夫



※受付番号：第 _____ 号

1 許可履歴	受付番号	許可年月日
	第 遺08-06 号	平成 20年 7月 15日
第 遺08-27 号	平成 20年 12月 26日	
第 _____ 号	平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日	
2 課題名	末梢血遺伝子発現解析を用いた薬物安全性バイオマーカーの検索	
3 変更する理由	試験薬を1種類追加したため。 研究者の追加・削減が必要になったため。 また、研究者の氏名・職名に変更があったため。	
4 変更内容の概要（変更内容を簡潔に箇条書きし、詳細は研究計画書に記入すること）	前立腺癌患者を対象とした試験薬にリン酸エストラムスチンナトリウムを追加した（試験方法の変更はなし）。 研究に参加できなくなった研究者を20名削減し、新たに13名を追加した。 また、一部の研究者の職名や苗字に変更があったため、修正した。	

注意事項 1 変更した内容が判別できるように記載した新たな研究計画書等及び既に許可された研究計画書等の写しを添付すること。

2 ※印は記入しないこと。

別記様式第3号（第14条関係）

遺伝子解析研究許可決定通知書

平成21年5月12日

申請者（研究責任者）
薬学講座臨床薬理学部門
安藤 仁 殿

自治医科大学

学長 高久 史 磨



受付番号：第 遺09-02号

課題等名

末梢血遺伝子発現解析を用いた薬物安全性バイオマーカーの検索
（遺08-27の変更）

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	承認	条件付承認	変更の勧告	不承認	中止	その他
理由、条件、勧告 又は意見						