

201010002A

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 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 増田 智先

平成 23 (2011) 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22年度 総括研究報告書

研究代表者 増田 智先

平成23(2011)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 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 | ----- | 22 |
|--|-------|----|

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

| | |
|-------|----|
| ----- | 28 |
|-------|----|

IV. 研究成果の刊行物・別刷

| | |
|-------|----|
| ----- | 30 |
|-------|----|

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

49例のヒト腎生検組織を用いたマイクロアレイ解析の結果、病理組織のスコアデータと比較解析することによって、8つの遺伝子クラスターを設定し、5つに分類した患者背景群との比較解析を行った。

ヒト尿を用いた検討では、シスプラチンを投与された肺がん患者 69例、その対照として収集したカルボプラチン投与患者 10例、タクロリムスを投与された肝臓移植患者 31例について随意尿を収集し、50を超える様々な尿中バイオマーカー候補分子の検出系構築と、それらの定量数値化を行った。その結果、KIM-1、NGALに加えてMCP-1も従来の血清クレアチニン値の変化に比してより高感度、特異的であるなど、シスプラチン腎症の検出に有用であることが示された。同時に見出された4つの候補分子についても検討を進め、新しい尿中の安全性バイオマーカーとして特許出願へと進めることができた。

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

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

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。特に、腎機能低下患者における薬剤性腎

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

障害は、常用量で引き起こされることが臨床問題視されている。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

Table I. AKIの診断ガイドライン

| stage | urine output | Scr, GFR |
|---------|---|---------------------------------------|
| risk | 0.5 mL/kg/hr が 6hr 持続 | Scr 1.5 倍以上 上昇 GFR 25% 以上 低下 |
| injury | 0.5 mL/kg/hr が 12hr 持続 | Scr 2 倍以上 上昇 GFR 50% 以上 低下 |
| 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 |

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、より迅速かつ確か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。研究計画最終年度である平成22年度では、(1)腎機能低下モデル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)ヒト腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析を行い、慢性腎臓病の重症度に関わる遺伝

子クラスターの抽出を試みた。(3) シスプラチンを投与された肺がん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(80、240mg/kg)、シスプラチン(2、5mg/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、バンコマイシン低投与量群(80mg/kg投与翌日)、バンコマイシン高投与量群(240mg/kg投与翌日)の計3群を用いた。メタボローム解析は、アジレント社CE-TOF MS(ヒューマンメタボロームテクノロジーズ社に委託)によるメタボローム解析を行った。CE-TOF MSによる解析の結果、221(カチオン147、アニオン74)の化合物が見いだされた。

(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重全摘(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)、5/6腎摘出ラット(腎摘出处置2週間後)および5/6腎摘出ラットにシスプラチンを投与したラットの残存腎を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

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(47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_®、アンビオン社)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 (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

生体肝移植術を施行された患者の尿について、移植翌日の尿を対照に 6 日おきに約 1 ヶ月収集した。特にタクロリムスによる腎障害が発症したと臨床的に診断された患者について、ラットと同様にヒューマンメタボロームテクノロジーズ社に委託して経時的なメタボローム解析を行った。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。

(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、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。

平成22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、腎垂全摘ラットの処置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、バンコマイシン(80、240mg/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30mg/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。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バン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に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。

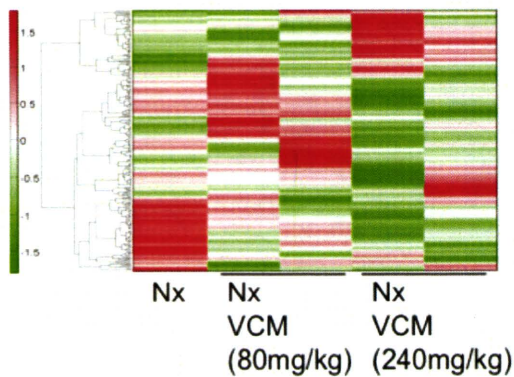


Fig. 1. ラット尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

昨年度に実施したヒト尿を用いた検討との比較から、今回得られたデータについては、一定の種差を考慮してもなお、ヒトとラットとの共通点が存在することが示された。

(2) ヒト腎生検組織を用いたマイクロアレイ解析による慢性腎臓病診断因子の探索

次に、指定研究との共同研究という側面から、ヒト腎生検組織のマイクロアレイデータを用いて、組織のスコアとの比較を行い、慢性腎臓病の診断に関連する遺伝子マーカーセットの選別を試みた。

Table 2 にはマイクロアレイデータを収集した総ての患者について、その背景因子をまとめたものを示している。今回集められた腎生検の多くは、IgA 腎症、膜

性腎症など糸球体病変を主訴とする原発性腎臓病の診断目的の余剰分である。従って、殆どの患者に投与されている薬物はステロイド薬であり、腎臓に対する副作用は余り知られていない。従って、今回の症例で得られる遺伝子情報は、主として慢性腎臓病の進展に関わる、或いは腎臓病の進展に伴って現れる適応の産物として考えられるものである。また、病理評価から得られた結果も考慮して、クラスター分類した結果、IgA 腎症については、予後良好群と不良群が *in silico* 解析からも分類された。特に、クラスター3には予後比較的不良群が収まり、クラスター4には予後良好患者が集まった。Lupus 腎炎の患者の内3例はクラスター4へ、1例がクラスター3へ、1例がクラスター1へ入った。抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連腎炎の2例についてはクラスター3と4に収まった。MPGN (膜性増殖性糸球体腎炎) の3例は、すべてクラスター3に収まった。膜性腎症の内4例はクラスター3へ、1例がクラスター2へ、2例がクラスター1へ収まった。一方、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、微小変化型ネフローゼ症候群、膜性腎症については、症例数が少ないこともあると考えるが、まとまったクラスターに分類されなかった。

Table 2. マイクロアレイ解析を実施した慢性腎臓病患者 49 例

| | | |
|--------------------|---------------------------|-----------|
| 男性/女性 (n) | 24 / 25 | |
| 年齢 (平均±SD) | | |
| 男性/女性 | 54.5 ± 15.3 / 41.5 ± 19.8 | P<0.05 |
| 血清クレアチニン値 (mg/dL) | 0.95 ± 0.41 | |
| 血中尿素窒素値 (mg/dL) | 16.5 ± 8.4 | |
| 原疾患 | | |
| IgA 腎症 | 19 | 内、微小変化群 4 |
| 膜性腎症 | 9 | |
| ループス腎炎 | 6 | |
| アミロイドーシス | 3 | |
| ANCA 関連腎炎 | 2 | |
| 糖尿病性腎症 | 2 | |
| 巣状糸球体硬化症 | 2 | |
| その他 | 6 | |
| 腎生検組織の評価(平均±SD) | | |
| 腎組織障害の Grade (1-4) | 1.9 ± 1.1 | |
| 組織標本中硬化糸球体の割合 (%) | 13.4 ± 14.5 | |
| 尿細管障害の Grade (1-4) | 2.1 ± 1.0 | |
| 細胞浸潤の Grade (1-4) | 1.9 ± 0.8 | |

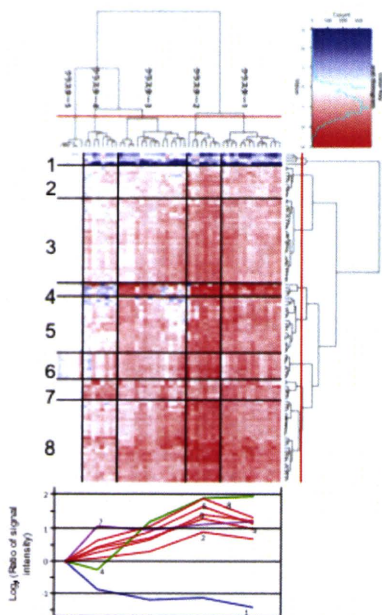


Fig. 2. ヒト腎生検組織を用いて得られたトランスクリプトームデータのヒートマップ (横軸：疾患クラスター；縦軸：遺伝子クラスター)

トランスクリプトームデータ 49 例分について、9 個の疾患群と対照群（市販の健常白人由来の腎組織 total RNA）のそれぞれの t 検定から、発現平均に有意に差のあるプローブを抽出し、クラスタリングを行った。t 検定は複数サンプルあるものについて行った。プローブを抽出する際の閾値は、 $P < 0.0001$ 、発現値(対照または疾患) > 500 に設定した。クラスタリング時に少なくとも一つの疾患サンプルでの変化が 2 倍より大きいか、1/2 倍未満の変動プローブを選んだ結果を Fig. 2 に示す。特に、IgA 腎症については症例数も多いことから、抽出された遺伝子プローブを用いてリアルタイム PCR を行い、各クラスターマ

ーカーとしての有用性評価に繋げたい。

(3) 腎機能低下モデルラットを用いた薬剤性腎障害のマーカー分子探索
常用量の薬物投与に依って急性腎不全を呈し、重篤な病状を示す殆どは高齢者等の潜在的な腎機能低下患者であることがこれまで指摘されてきた。これまで、正常ラットに高用量の薬物を負荷したモデル実験系を用いて、様々な薬剤性腎障害のバイオマーカーが調べられてきた。他方、虚血再灌流障害を主とした薬物を使用しない急性腎障害モデル動物を用いたバイオマーカーの探索も並行して行われてきた。しかしながら、腎機能低下患者における常用量の薬物による AKI 発症という実際の臨床における問題点を忠実に再現したモデル系が殆ど行われてこなかったため、過去に見出されてきたマーカー候補分子の殆どが実地診療に使用できない状態であることも問題である。

そこで、5/6 腎摘出 2 週目の代償性腎不全期モデルラットに低用量のシスプラチンをふかしたモデルラットを作成し、近位尿細管を単離してマイクロアレイ解析を行った。得られたデータと既に保有している正常ラットで得られた結果を照らし合わせ、代償性腎不全期において特異的に変化を示す遺伝子セットを抽出し、腎機能低下状態における薬剤性腎障害検出用のマーカー候補分子として評価を行った。

Fig. 3 には 5/6 腎摘出 2 週目のラットに溶解液のみまたは低用量シスプラチンを投与したラットにおける生化学的パラメータの推移を示している。シスプラチン投与翌日に血漿クレアチニン値の軽度上昇を示しているが、他のパラメータについては大きな変化を見せず、これら古典的なマーカーからだけでは、実際の薬剤性腎障害を見逃している危険性を再現している。

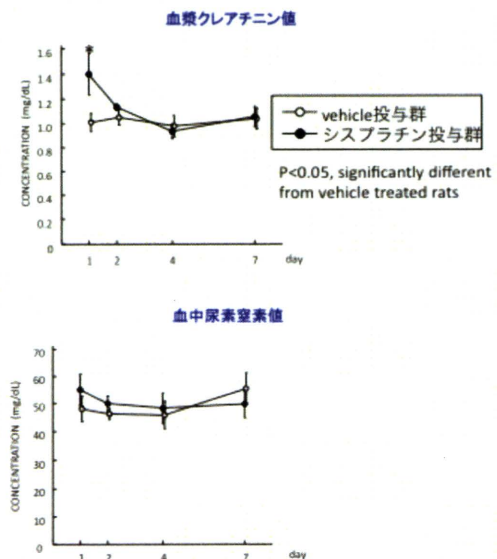


Fig. 3. 5/6腎摘出ラットに溶解液 (vehicle) またはシスプラチン (2mg/kg) 投与した後の血漿クレアチニン値、血中尿素窒素値の推移

次に、これらのラット腎由来近位尿細管を用いたマイクロアレイの結果を示す。2mg/kg (約 1300 プローブ) に比して 5mg/kg (約 4000 プローブ) の方がより多くの遺伝子発現に変化を来している。(Fig. 4) しかし、過去の経験から正常ラットにおいて 2mg/kg 投与のデータでは 400 プローブしか変化を示さなか

ったことから、代償性腎不全期という腎機能低下状態における低用量シスプラチンによるダメージがより大きいことが示された。

時においては、新たなマーカーが必要であることが示唆された。

Table 3. シスプラチン投与によって有意に変化した遺伝子プローブ

| Probe ID | cisplatin | |
|-------------|------------------------|------------------------|
| | 5 mg/kg Log2(ratio) | 2 mg/kg Log2(ratio) |
| 17781 | 2.46 | 4.88 |
| 5892 | 1.87 | 4.63 |
| 22196 | 1.02 | 4.35 |
| 28409 | 2.52 | 3.78 |
| 38986 | 1.33 | 3.38 |
| 21875 | 1.35 | 3.22 |
| 25321 | 2.84 | 3.19 |
| 19643 | 1.2 | 3.14 |
| 21215 | 1.54 | 3.02 |
| 8959 | 3.33 | 3 |
| 283 | 1.8 | 2.93 |
| 10530 | 3.28 | 2.84 |
| 31906 | 1.64 | 2.84 |
| 21521 | 1.18 | 2.8 |
| 35116 | 1.67 | 2.69 |
| 5519 | 1.19 | 2.59 |
| 17809 | 1.6 | 2.52 |
| 31239 | 3.16 | 2.52 |
| 18270 | 1.63 | 2.49 |
| 16351 | 1.74 | 2.49 |
| 18270 | 1.63 | 2.49 |
| 16351 | 1.74 | 2.49 |
| 15117 | 1.31 | 2.42 |
| 19339 | 2.06 | 2.41 |
| 5939 | 2.13 | 2.35 |
| 1265 | 6.01 | 2.33 |
| 32135 | 3.85 | 2.3 |
| 38757 | 1.38 | 2.3 |
| 10472 | 2.56 | 2.26 |
| 9196 | 2.83 | 2.23 |
| 20402 | 1.32 | 2.21 |
| 24721 | 1.03 | 2.19 |
| 16672 | 1.67 | 2.18 |
| 25388 | 3.94 | 2.17 |
| 20620 | 3.03 | 2.17 |
| 5709 | 1.03 | 2.17 |
| 18736 | 1.13 | 2.11 |
| 17986 | 1.29 | 2.03 |
| 2419 | 1.94 | 2.03 |
| 2694 (CCL2) | -0.75 | 0.6 |

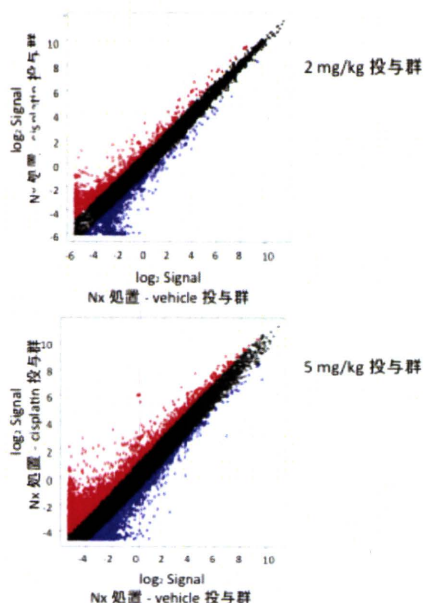


Fig. 4. 5/6腎摘出ラットに溶解液 (vehicle) またはシスプラチンを投与した後の単離近位尿細管におけるトランスクリプトームデータ

Table 3 には、5/6 腎摘出 2 週目のラットにシスプラチンを 2mg/kg または 5mg/kg で腹腔内投与し、2 日目の単離近位尿細管で得られた遺伝子発現データの内、統計的に有意 ($p < 0.001$) であったプローブについて一覧にしている。再下段には、正常ラットを用いて見出された CCL2 に相当するプローブを別途挙げている。この結果、正常ラットで見出された CCL2 については、代償性腎不全期ラットにおいて有意に上昇を示し得ないことが示され、腎機能低下

これらの内、プローブ 2696 (CCL2) に加えてプローブ 32135 に着目し、特異

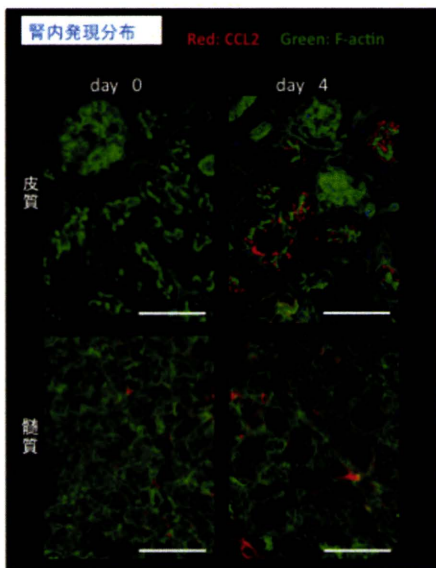


Fig. 5. 5/6腎摘出2週目のラットにシスプラチンを5mg/kg投与した後のCCL2発現

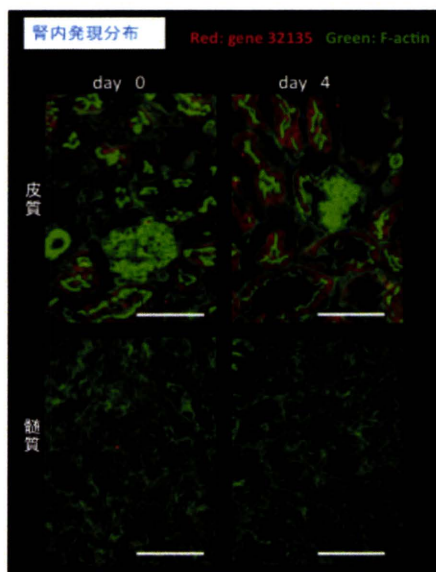


Fig. 6. 5/6腎摘出2週目のラットにシスプラチンを5mg/kg投与した後のgene 32135産物の発現

抗体を用いたタンパク発現について検討を進めた。その結果、Fig. 5、6 に示すように CCL2 においても vehicle 投与群に比して上昇することが示されたが、プローブ 32135 ではその上昇の度合いがより顕著であり、プローブ 32135 にコードされる遺伝子産物は、腎機能低下状態におけるシスプラチン腎症のマーカー候補であることが示された。

さらに、尿中に漏出されるこれらタンパク質の変化についても検討を行ったところ、期待通り、これらマーカー遺伝子の産物は腎機能低下患者においてもシスプラチン腎症を検出するための有用な非侵襲バイオマーカーであることが示唆された。(Fig. 7)

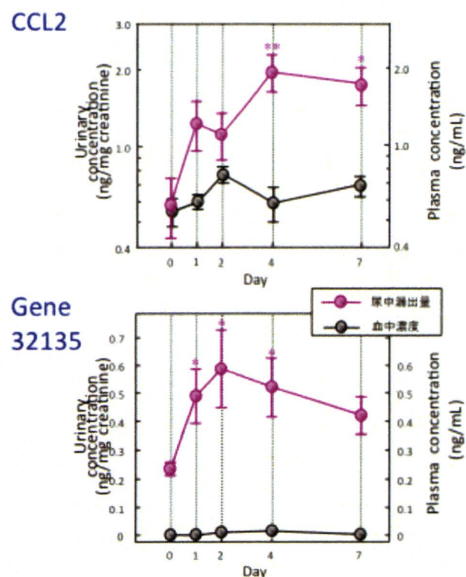


Fig. 7. 5/6腎摘出2週目のラットにシスプラチンを5mg/kg投与した後の血中または尿中のCCL2及びgene 32135産物の発現

(4) ヒト尿を用いたバイオマーカーの定量数値化および評価

外科的切除術が不能と診断された肺がん患者の中で、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、4週間おきに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（シスプラチンの腎毒性蓄積）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がん患者の尿を用いた検討を進めた（のべ 39 例）。なお、陰性コントロールとして、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（19 例）。

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、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に特化した試薬（標識抗体、KIM-1 標品）の供与を受け、同様の手法にて検討した。

今年度では総ての症例について尿中バイオマーカーの評価を行った。KIM-1 については、「2 ng/mg creatinine (Cre)」をカットオフとして用いられている。そこで、シスプラチンを投与された肺がん患者とカルボプラチンを投与された肺がん患者を対象に、投与後の尿中 KIM-1 濃度を調べた。その結果、総ての測定点において薬剤投与後の尿中 KIM-1 濃度が 2 ng/mg Cre を上回った割合は、シスプラチン投与群で 68%、カルボプラチン投与群で 36%であり、60mg/sqm という低用量のレジメンであるにも拘わらず、約 70%の患者において AKI と診断すべきであることが示された (Fig. 8)。興味深いことに、殆ど腎障害を示さないことが知られるカルボプラチンについても、少なからず尿中バイオマーカーの上昇を認めることが判明した。

次に、MCP-1 をはじめ他の尿中バイオマーカーの漏出量と尿中 KIM-1 濃度との関連性について検討を行った。その結果、尿中 MCP-1 濃度は KIM-1 と良好な正の相関関係を示したが (Fig. 9)、

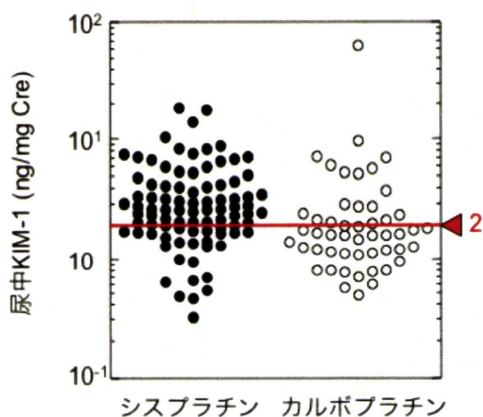


Fig. 8. シスプラチンまたはカルボプラチン投与後の尿中KIM-1濃度
投与前以外の全てのポイント（シスプラチン88点、カルボプラチン50点）2ng/mg Creは、尿中KIM-1のgolden standard.

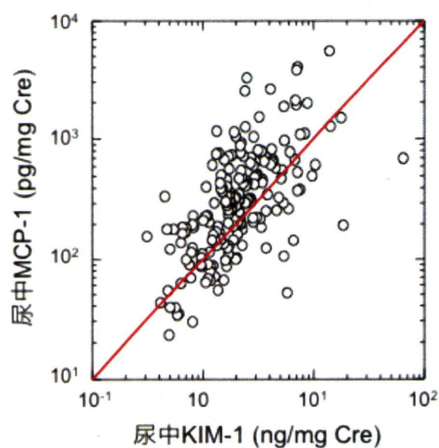


Fig. 9. 尿中のKIM-1とMCP-1との比較
投与前以外の全てのポイント（シスプラチン88点、カルボプラチン50点）を集計した結果を示す。r=0.620

NGAL、osteopontin、albumin、cystatin C、clusterin との相関性は認めなかった。一方、尿中 L-FABP は KIM-1 と正の相関

性を示したが、数値として検出できたのが 200 ポイント以上の検体の内僅か 13%であり、殆ど検出限界未満であった (Figs. 10 & 11)。なお、同条件の検体において尿中 KIM-1、MCP-1 の検出はそれぞれ 100%、96%であり、ほぼ全ての尿検体において検出可能であることが示された。

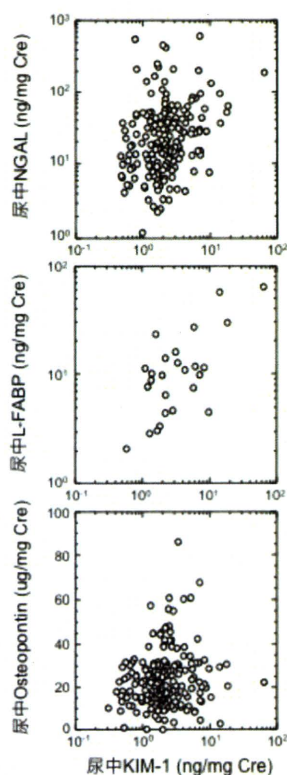


Fig. 10. 尿中におけるKIM-1とNGAL、L-FABP、オステオポンチンとの比較

全208測定点の内、NGAL、L-FABP、オステオポンチンはそれぞれ85%、13%、98% 数値として検出できた。

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

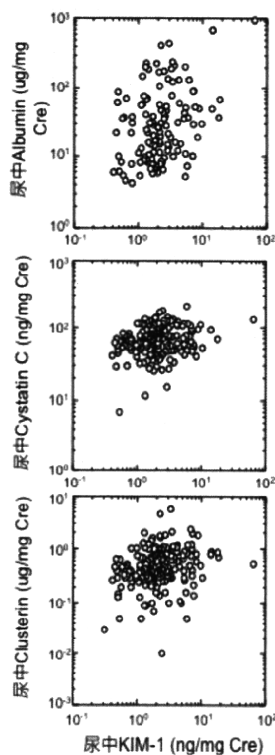


Fig. 11. 尿中におけるKIM-1とアルブミン、シスタチンC、クラスタリンとの比較

全208測定点の内、アルブミン、シスタチンC、クラスタリンはそれぞれ62%、93%、99% 数値として検出できた。

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。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。今回見出されたバイオマーカー分子は、近位尿細管を純化した試料を用いて見出されたものであり、以後の検討においてもその腎内分布は近位尿細管に選択的であり、細胞の障害に応じて変化することを認めた。

さらに、肺がん患者の尿検体を用いた検討から、虚血性腎疾患の尿細管障害マーカーとして確立されつつある KIM-1 を対照に、7 種類のバイオマーカー分子について調べた結果、MCP-1 は期待通り、良好な相関を示したが、他のマーカー分子については期待はずれのものであった。これらは、KIM-1 や MCP-1 はほぼ全ての症例において検出されること、他のマーカー分子については検出されない症例が多いため、以後の評価が不可能なことが挙げられる。特に、MCP-1 はタンパク質として頑強であり、患者自身が採取し、冷蔵保存した尿において良好に検出されることを確認している。実地診療において超低温冷凍庫などの設備を不要とするなどタンパク質としての安定性の高さは、有利に働くと考える。

E. 結論

平成 22 年度では、これまでラットを用いて見出されてきたバイオマーカー候補分子のヒトにおける有用性について検討を進め、少なくとも尿中 MCP-1 は、肺がん患者におけるシスプラチン腎症を高感度かつ特異的に検出する新しい非侵襲バイオマーカーであることを見出し、当初の予定を達成することが出来た。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Masuda S, Inui K & Chiba T: Tacrolimus Therapy as an Alternative to Thiopurines for Maintaining Remission in Patients With Refractory Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol*: (2011). **In press**
- (2). Ho G, Yonezawa A, Masuda S, Inui K, Sim KG, Carpenter K, Olsen RK, Mitchell JJ, Rhead WJ, Peters G & Christodoulou J: Maternal riboflavin deficiency, resulting in transient neonatal-onset glutaric aciduria Type 2, is caused by a microdeletion in the riboflavin transporter gene GPR172B. *Hum Mutat*, 32 (1): E1976-1984 (2010).
- (3). 増田智先: 【高齢者の慢性腎臓病 (CKD)】 高齢者における薬物投与の注意. *Geriatric Medicine*, 48 (8): 1057-1061 (2010).
- (4). 増田智先: 【医薬品情報提供活動の新しい潮流】 高度医療における医薬品情報提供と薬剤師の役割 移植医療 移植医療における情報提供 肝臓移植. *薬事*, 52 (13): 2019-2024 (2010).
- (5). Yoshino T, Nakase H, Honzawa Y, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, Ueno S, Uza N, Masuda S, Inui K & Chiba T: Immunosuppressive effects of tacrolimus on macrophages ameliorate experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 16 (12): 2022-2033 (2010).
- (6). Yao Y, Yonezawa A, Yoshimatsu H, Masuda S, Katsura T & Inui K: Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain. *J Nutr*, 140 (7): 1220-1226 (2010).
- (7). Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Masuda S, Inui K & Chiba T: Efficacy and safety of infliximab as rescue therapy for ulcerative colitis refractory to tacrolimus. *J Gastroenterol Hepatol*, 25 (5): 886-891 (2010).
- (8). 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).
- (9). 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): F923-934 (2010).
- (10). 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).
- (11). Ichikawa M, Miwa K, Yamasaki T, Nakagawa I, Takizawa S, Masuda S & Inui K: Time-saving multiplex detection of single nucleotide polymorphisms by ultrasensitive DNA microarray. *J Biochem*, 148 (5): 557-563 (2010).
2. 学会発表
・ 国際学会
- (1) Satohiro Masuda, Kumiko Nishihara, Shunsaku Nakagawa, Atsushi Yonezawa, Ken-ichi Inui: Role of Cyclin B2 and Cell division cycle 2 in hyperplasia of epithelial cells in progressive renal failure (国際腎臓学会 (ISN) NEXUS 2010 “*The Kidney and the Vascular System: Emerging Culprits in Pathogenesis and Advances in Therapy*” ; 2010.4.15-18、国立京都国際会館) (一般ポスター)
- (2) Ikuko Yano, Mai Shibata, Sachiyo Yasuda, Akira Yokomasu, Keiko Hosohata, Satohiro Masuda, Akio Ikeda, Ryosuke Takahashi, Ken-ichi Inui: Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of clobazam and its active metabolite in Japanese adults with refractory epilepsy. (WORLD PHARMA 2010; 2010.7.17-23、Bella Center、Copenhagen、Denmark) (一般ポスター)
- (3) Satohiro Masuda, Shunsaku Nakagawa, Kumiko Nishihara, Ken-ichi Inui: Paradoxical influences of mTOR inhibitor everolimus on progressive renal failure. (WORLD PHARMA 2010; 2010.7.17-23、Bella Center、Copenhagen、Denmark) (一般ポスター)
- (4) Atsushi Yonezawa, Yoshiaki Yao, Hiroki Yoshimatsu, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui: MOLECULAR CLONING AND COMPARATIVE FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF

- HUMAN RIBOFLAVIN TRANSPORTERS RFTs. (9th international ISSX meeting; 2010.9.4-8, Istanbul Convention and Exhibition Centre, Istanbul, Turkey) (一般ポスター)
- (5) Masahiro Tsuda, Shingo Watanabe, Atsushi Yonezawa, Tomohiro Terada, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui: PREDOMINANT ROLE OF H⁺/ORGANIC CATION ANTIporter MATE1/SLC47A1 IN THE RENAL TUBULAR SECRETION OF METFORMIN AND CEPHALEXIN (9th international ISSX meeting; 2010.9.4-8, Istanbul Convention and Exhibition Centre, Istanbul, Turkey) (招聘講演)
- (6) Moto Kajiwara, Tomohiro Terada, Shingo Watanabe, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura, Ken-ichi Inui: Involvement of MATE1 in renal tubular secretion of varenicline. (Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 ; 2010.11.14-18、 Morial Convention Center、 New Orleans、 Louisiana、 USA) (一般ポスター)
- (7) Tomoko Sato, Satohiro Masuda, Toshiya Katsura, Ken-ichi Inui: Flux of platinum agents by MATE2-K rather than MATE1 in the double transfectants with basolateral OCT2 in MDCK monolayers (Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 ; 2010.11.14-18、 Morial Convention Center、 New Orleans、 Louisiana、 USA) (一般ポスター)
- (8) Satohiro Masuda, Kumiko Nishihara, Atsushi Yonezawa, Aiko Ozawa, Takaharu Ichimura, Joseph V. Bonventre, Ken-ichi Inui: Microarray analysis of isolated proximal tubules in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. (ASN RENAL WEEK 2010 ; 2010.11.16-21、 Colorado Convention Center、 Denver、 Colorado、 USA) (一般ポスター)
- (9) Tomoko Sato, Satohiro Masuda, Aiko Ozawa, Yosuke Togashi, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Takaharu Ichimura, Joseph V. Bonventre and Ken-ichi Inui: Time-dependent changes of urinary biomarkers in the lung cancer patients after cisplatin-based chemotherapy. (ASN RENAL WEEK 2010 ; 2010.11.16-21、 Colorado Convention Center、 Denver、 Colorado、 USA) (一般ポスター)
- (10) Satohiro Masuda, Sachiyo Yasuda, Risa Kinoshita, Ikuko Yano, Toshiya Katsura, Eri Ogawa, Mari Sonoda, Narihito Takada, Kohei Ogawa, Shinji Uemoto: Effectiveness