

201010002B

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

薬剤性腎障害の非侵襲性マーカーの探索と
臨床的重要性の解明に関する研究

(課題番号 H20-バイオ-一般-002)

平成20年度～22年度 総合研究報告書

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 増田 智先

平成23(2011)年5月

目 次

I.	総合研究報告書		
	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.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	54
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	61

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））

総合研究報告書

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

ラット単離尿細管を用いた網羅的遺伝子発現解析系を確立し、純化試料を用いた高感度なトランスクリプトーム解析を進めた。その結果、薬物を用いない代償性腎不全期、慢性腎不全期における遺伝子発現データを先ず収集した。別途シスプラチンなどの薬剤性腎障害惹起ラットの腎近位尿細管における遺伝子発現データを収集、腎機能低下ラットに対する薬物負荷状態におけるトランスクリプトームデータの収集を系統的に進め、薬物負荷による近位尿細管の反応を的確に反映する遺伝子セットの抽出に成功した。並行して進めた慢性腎不全患者由来の腎生検におけるトランスクリプトームデータの収集では、ラットで得られたデータと同様に、薬物に依らない様々な遺伝子発現情報を収集することが出来、収集される遺伝子発現データの中から非特異的なものの排除に非常に役立つ貴重な情報として活用することが出来た。さらに、外科的切除術適応外となった進行性肺がん患者に対する抗がん剤治療を受けた60例超の患者に協力をいただき、シスプラチン、カルボプラチン投与後の随意尿を経時的に採取し、ラットを用いて見出された尿中バイオマーカー候補分子のヒトにおける挙動について検討を進めた。その結果、尿中のMCP-1は、最近注目されているKIM-1やNGALに加えて有用なシスプラチン腎症検出のための尿中バイオマーカーであることが示された。同時に見出され、検討を進めている4分子（タンパク質）、6分子（低分子化合物）については、特許出願のため記載を割愛する。以上、本研究プロジェクトによって、薬剤性腎障害に特異的かつ高感度な尿中（非侵襲）バイオマーカーの特定に成功し、臨床的有用性を示すことが出来た。

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 京都大学名誉教授・京都薬
科大学学長

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

三嶋理晃 京都大学医学部附属病院
呼吸器内科教授

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

A. 研究目的

集中治療室 (ICU) における急性腎不全のうち 20%は薬剤に起因しその 50-80%が死に至る。このため、腎障害を誘発・増悪させる潜在的要因を持つ患者への様々な薬物 (造影剤、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬) の使用には、腎機能 (尿細管薬物輸送能) を正確に把握した上で患者個々に応じた薬物投与設計に加え、薬剤性腎障害の速やかな発見と適切な対応が望まれている。近年、Acute Renal Failure (ARF)は Acute Kidney Injury (AKI)として再考されている。AKI は、直近 48 時間以内における血清クレアチニンや尿量の変化を指標に全 3 期に分類され、第 III 期では持続性血液透析療法など腎代替療法の速やかな導入が推奨されている。一方、AKI 発症から血清クレアチニン値上昇に要する時間には個体差が大きく、より迅速かつ的確に AKI を診断するためのバイオマーカーの特定と臨床応用が喫緊の解決課題とされている。

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

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 未滿が 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ー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ー 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、メタボローム、病理解析を並行して、より迅速かつ的確な薬剤性腎障害の非侵襲性マーカー探索とその臨床的重要性を解明するという計画を立案した。

B. 研究方法

(1) ラット薬剤性腎障害モデルの作製とメタボローム、プロテオーム解析

・虚血再灌流モデルラットの作成

7 週齢の Wistar/ST 雄性ラットの両腎を 5、15、30 分虚血後、開放し膀胱尿をタンパク質分解阻害剤入りのチューブに氷冷下で回収した（開放後 60 分間）。尿サンプルはクレアチニン濃度（10

mg/dL）で補正し、凍結保存とした。血漿サンプルは凍結保存し、病理標本作成用組織サンプルはカルノイ液による固定の後 PAS 染色に供した。

・薬剤性腎障害モデルラットの作製

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

・尿サンプルを用いたメタボローム解析

各モデルラットについてそれぞれ 5-6 例作製し、血漿生化学データを指標に抽出した 3 例分を 1 群としてプール、コントロール群、虚血再灌流（5、15、30 分）群、VCM 腎症（40mg/kg、400mg/kg）、CDDP（5mg/kg）の計 7 群として、質量分析（ウオーターズ社 LC-TOF MS ジナリス社に委託（平成 20、21 年度）；アジレント社製 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（平成 22 年度））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。他方、CE-TOF MS による解析では 221 (カチオン 147、アニオン 74) 化合物が同定、定量数値化された。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。

・尿サンプルを用いたプロテオーム解析

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

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

・慢性腎不全モデルラットの作製

慢性腎不全モデル動物として腎盂全摘 (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、一個体あたり 20mm の近位尿細管を採取した。

・トランスクリプトーム解析

単離尿細管サンプルは、グアニジン・チオシアネート含有変性剤を用いて瞬時に溶解し、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA からアプライドバイオシステムズ社の RNA 増幅・標識キットを用いて、ジゴキシゲニン標識 cRNA を作成した。標識した cRNA (10 µg) を断片化した後、Rat Genome Survey Microarray (アプライドバイオシステムズ社) にハイブリダイズ (55°C、16 時間) させ、AB1700 (アプライドバイオ

システムズ社) を用いて化学発光系シグナルの検出を行った。数値解析および遺伝子機能・パスウェイ解析にはそれぞれ Spotfire®および MetaCore™を用いた。

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

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

・ 低分子化合物

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

・ タンパク質

尿中タンパク質については、各種 ELISA キットまたは BioPlex サスペンションビーズアレイシステムを用いた同時多項目測定法 (47 項目同時定量) を用いて調べた。

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

・ ヒト腎生検組織を用いたトランスクリプトーム解析

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

・ ヒト腎生検由来 total RNA のクオリティーチェック

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

シスプラチン、カルボプラチンを投与された肺がん患者の尿を投与後経時的に回収した(投与直前、投与後 3、7、14、21、28 日目)、バンコマイシンを投与され AKI を呈した患者の随時尿を回収した。また、生体肝移植術を施行された患者の尿について、移植翌日の尿を対象に 6 日おきに約 1 ヶ月収集した。薬剤性腎障害が臨床的に診断された患者、そのコントロールとなる尿検体を用いて、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

随意尿をもちいて、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。尿は、採取後タンパク質分解酵素阻害薬カクテルを予め用意したスピッツに採取し、4 度で病棟に保管した。回収の後に-80 度で保管する

こととした。

(6) 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。

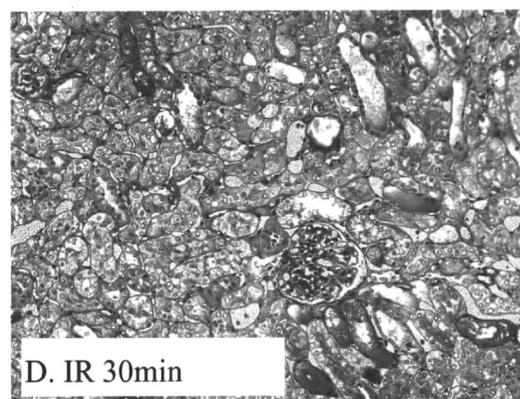
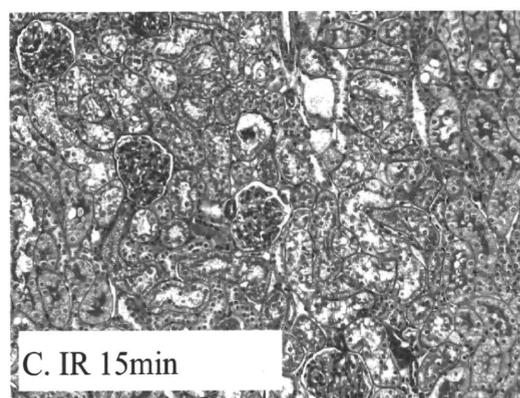
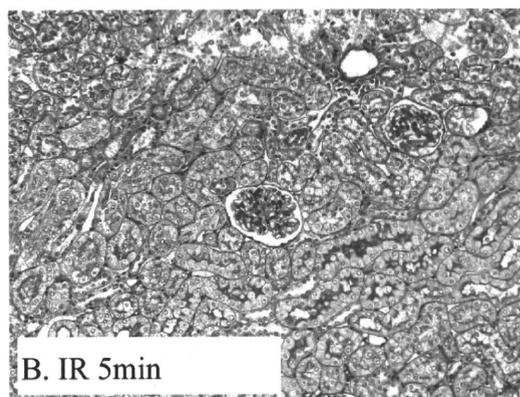
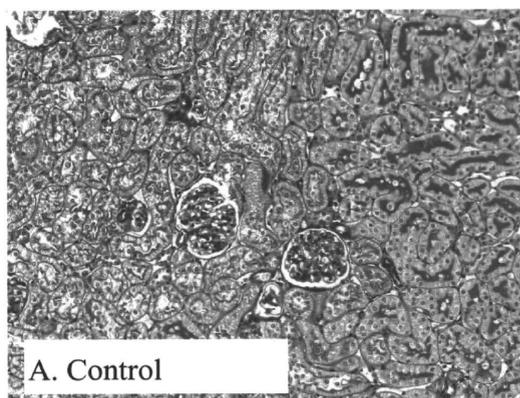
(7) 安全対策に対する対応

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。今年度では、入院患者において頻度が



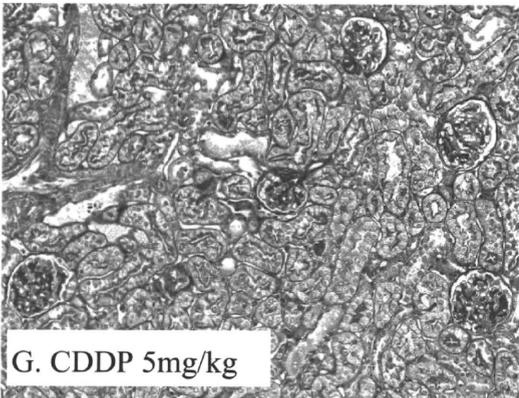
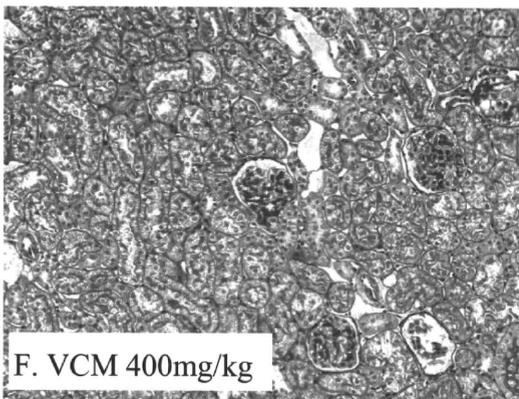
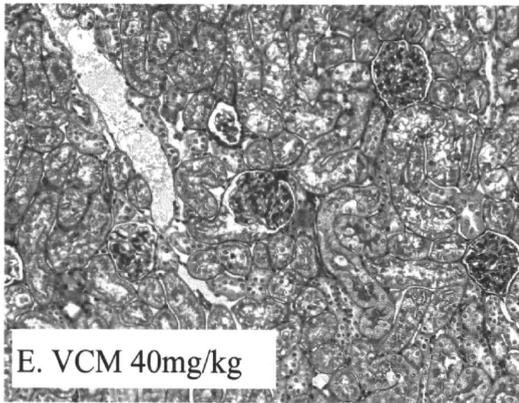


Fig. 1. 虚血再灌流 (IR)、バンコマイシン (VCM) またはシスプラチン (CDDP) 投与により作製した AKI モデルラットの腎組織像 (PAS 染色). 特に、近位尿管の管腔側刷子縁膜の脱落、上皮細胞の空洞化・変性がより強い処置によって顕著になる。

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。

Table 1. オミクス解析に用いたラットの生化学的検査データ

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

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

先ず非薬剤性 AKI のモデルとして虚血再灌流障害 (IR 5分、15分、30分) を対照として選択し、正常ラットに対してシスプラチン (CDDP、5mg/kg、腹腔内投与) またはバンコマイシン (VCM、40mg/kg、400mg/kg を尾静脈内投与) 処置の後 2 日目にサンプル回収を行った。Table 1 に示すように、IR 5分、15分、VCM 40mg/kg、CDDP 5mg/kg を処置されたラットの血清生化学データは特に重症度を示さない。同様に、尿中クレアチニンやアルブミン濃度も変化は認められるものの、重篤とまでは考えられないが、特に CDDP 処置の場合、経日的に腎機能は悪化することから、早期段階における AKI の検出が臨床においても重要と考えられる。これらの想定の下、本研究では比較的軽度な (臨床用量に準ずる) AKI ラット尿を用いバイオマーカー分子の探索を行った。Fig 1 には、検討に用いたラット腎組織を PAS 染色した結果を示す。

・メタボローム解析

Fig. 2.に示すように LC-TOF MS による解析の結果、生化学的パラメータ上ではほぼ同程度の AKI が発症していたにもかかわらず、尿中に見いだされる化合物のパターンは大きく異なることが示された。得られた 2200 程度のシグナルから、方法に示した 4 つの条件を満たすもの 800 種程度に絞り、化合物の構造が絞り込めるものかつ標品が入手可能なものを選別した結果、5 種類の低分子化合物を選別するに至った (Fig. 3)。

これらの結果を踏まえて、薬剤性腎障害の中用量モデルと低用量モデルと

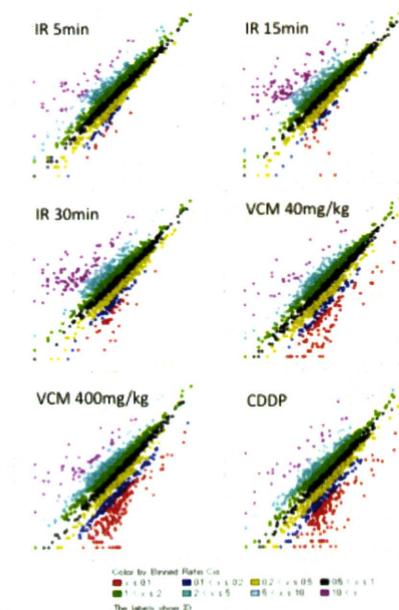


Fig. 2. メタボローム解析結果の散布図。処置によって、パターンが異なることが示された。

Table 2. 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
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 3. 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

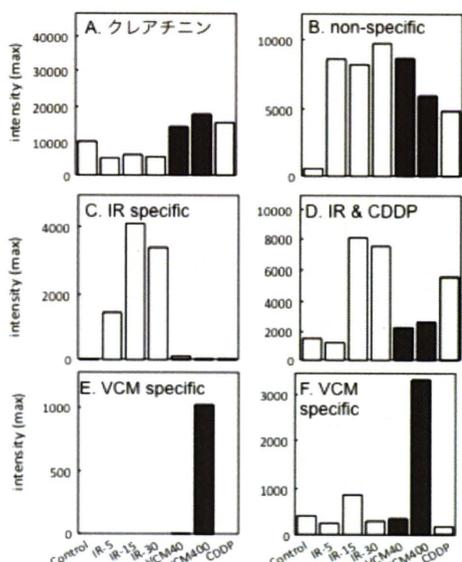


Fig. 3. メタボローム解析によって見いだされた尿中低分子化合物バイオマーカー候補。尿中クレアチニン濃度を同程度に調節した後に解析を行ったため、クレアチニン濃度はほぼ同程度。

の比較を行った。すなわち、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、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 2.には、各群の生化学的パラメータをまとめた。また、Table 3.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. 4. 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

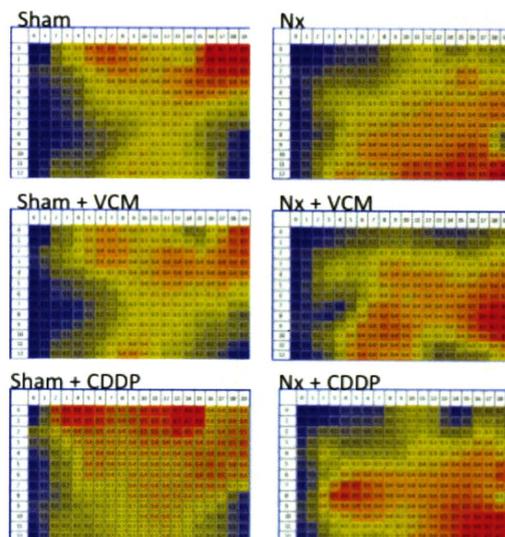


Fig. 4. ラット尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

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. 5.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

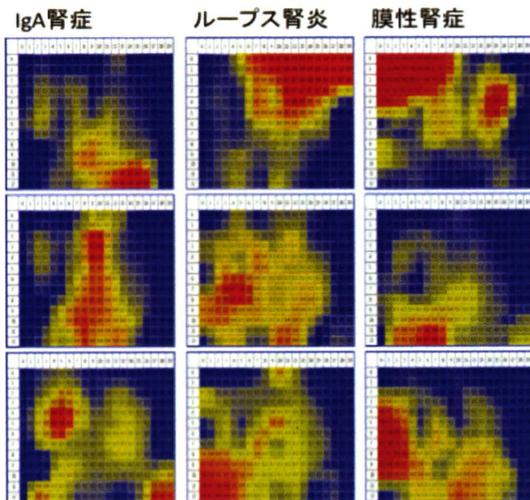


Fig. 5. ヒト尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

的に診断が確定した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)

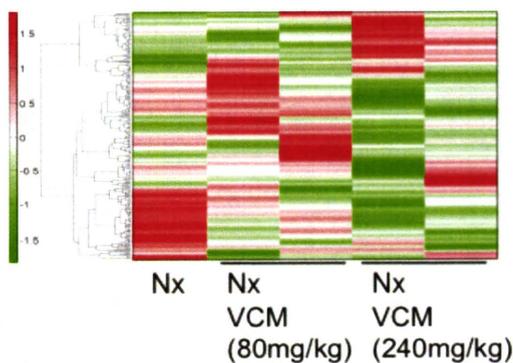


Fig. 6. ラット尿を用いたメタボローム解析。ヒートマップによる低分子化合物のプロファイル

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。さらに、LC-TOF-MS から CE-TOF-MS に解析機器を変更した場合において、低用量バンコマイシン腎症を示す候補化合物がいくつか抽出された (Fig. 6)。これらの中から、標品の入手が可能な化合物を選定し、研究室にて保有している質量分析機器による検出系の構築を行った (Fig. 7)。

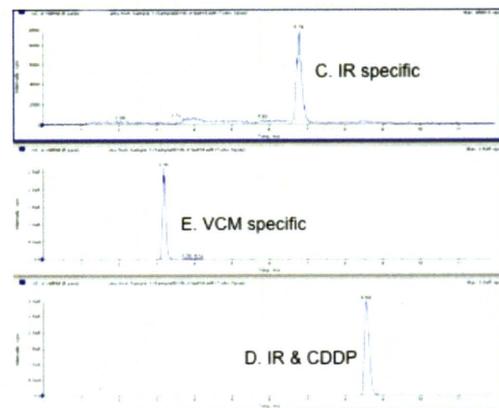


Fig. 7. メタボローム解析によって見いだされた尿中低分子化合物バイオマーカー候補の測定系構築。図中の記号等はFig. 3.に対応する。従って、Fig. 3.のIR specific (C)、IR及びCDDP感受性 (D) 及びVCM specific (E) に尿中へと漏出する低分子化合物の同時測定系の構築に成功した。

・プロテオーム解析

メタボローム解析で用いた尿の余剰分を de novo sequencing 解析に用いた。156 種類のペプチド断片が検出され、コントロール尿と比べて 2.5 倍以上の上昇という条件を設定し、データベースとの比較解析の結果、IR で 7 種、VCM のみで 1 種、CDDP のみで 1 種のタンパク質が見いだされた。一部を Fig. 5. に

示す。その結果、IR 15分、VCM 400mg/kg、VCM 400mg/kg 及び CDDP 5mg/kg 投与によって尿中に漏出されるタンパク質の検出に成功した (Fig. 8)。

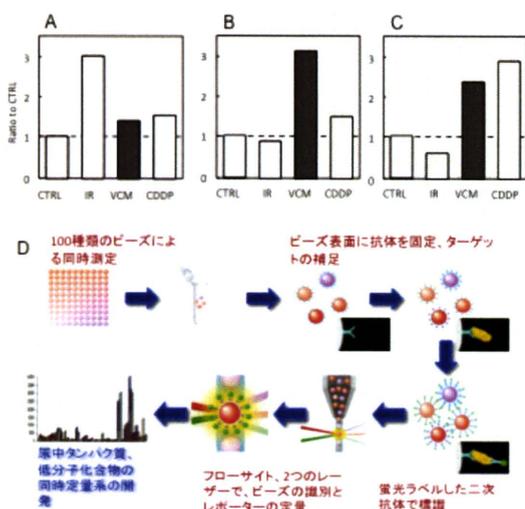


Fig. 8. プロテオーム解析によって見いだされた尿中バイオマーカー候補タンパク質。(A) IR 15min specific, (B) VCM 400mg/kg specific, (C) 薬剤性AKI感受性 (すべてコントロールに比べて2.5倍以上上昇)。(D) サスペンションビーズアレイの測定原理。

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

腎臓の近位尿細管には異物解毒を担う薬物トランスポーターが複数存在しており、能動的な薬物の尿細管分泌を媒介している。さらに、心拍出量の25%が流れ込む腎臓は高濃度の薬物にさらされることが想定される。従って、血中濃度に比較して高濃度に蓄積した薬物による細胞毒性は、近位尿細管で特に危険性が高いと考えられる。一方、これまでの研究で得られた情報では、高用量の薬物による腎毒性の結果、重篤な末期腎不全状態における結果など

臨床における「腎機能低下患者における常用量の薬物による腎障害」を正確に反映し得ない。そこで、腎垂全摘モデルラット (5/6 腎摘出ラット) を作製し、薬物を使用しない条件における慢性腎不全の進展過程における近位尿細管遺伝子発現の変化を調べ、薬物負荷による変化の基礎データとすることとした。また、ヒトと同様に、5/6 腎摘出ラットでは、術後早期における代償性腎不全期を呈する。すなわち、残存腎による代償反応によって、単位ネフロンあたりの糸球体濾過速度が亢進し、見かけ上機能維持、多尿等の症状を呈する。臨床で見られる腎機能低下患者における薬剤性腎障害の多くは代償性腎不全期において散見されるため、代償性腎不全期の進展過程における重要な分子メカニズムの解明についても検討を進めた。

・単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析の有用性

Fig. 9. 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。Fig. 10. に示すように、実体顕微鏡下单離した近位尿細管 (20mm) における遺伝子発現プロファイルは、他の細胞や小器官由来の遺伝子発現データを最小限にすることができ、他の細胞由来の遺伝子

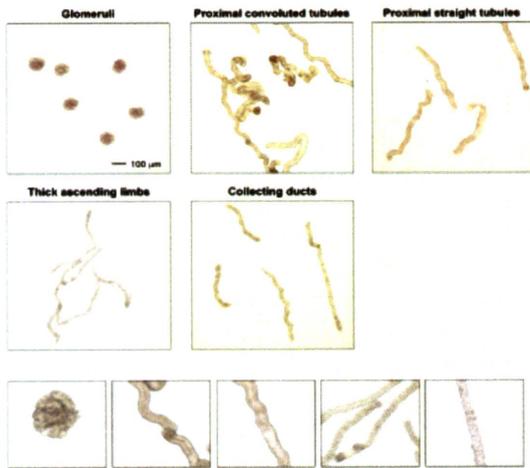


Fig. 9. 単離尿細管各分節

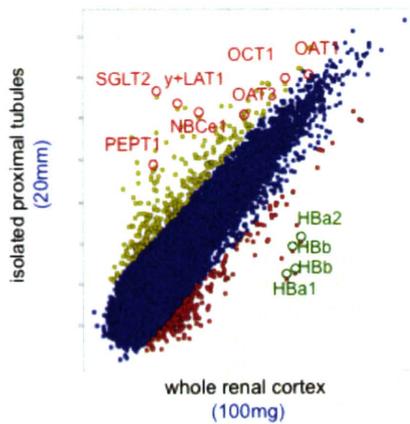


Fig. 10. ラット単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析。近位尿細管20mmで得られるシグナルは、whole kidneyと比べてより強く、また混入血球細胞由来と考えられる遺伝子のシグナルは弱い。すなわち、近位尿細管におけるイベントに焦点を当てることのできる手法であると考えられる。

発現に左右されない解析法と考えられた。特に、近位尿細管に豊富に発現する薬物トランスポータ、栄養物質トランスポータ遺伝子の発現パターンは、whole kidney を試料とした場合に比べ

て上に凸であること、血球細胞由来と考えられる遺伝子シグナルは下に凸であった。これまで、AKI や慢性腎不全において腎繊維化における重要遺伝子とされてきた TGF-beta は、近位尿細管を用いた解析では検出されず、混入した血球由来のものであることが強く示唆された。

・慢性腎不全の進展過程における遺伝子発現プロファイル

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

Fig. 11.には、5/6 腎摘出ラットにおける

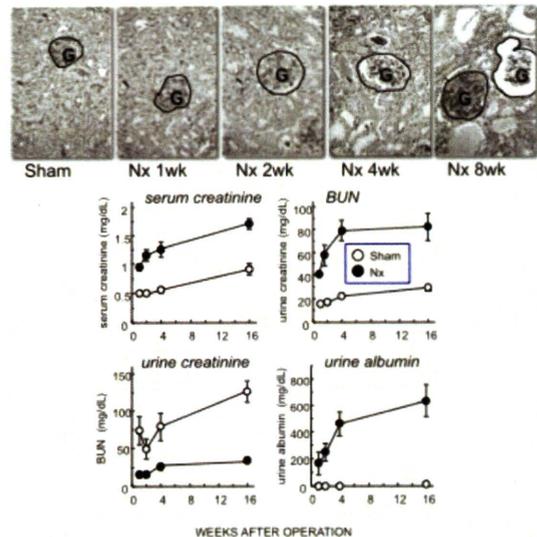


Fig. 11. 5/6腎摘出 (Nx) ラットの経目的な病変進展。2週目まででは、糸球体や尿細管の肥大が見られるが、8週目ではリンパ球・マクロファージの浸潤や間質の繊維化が著明に認められる。図中Gは糸球体を示す。

術後経過に応じた腎病変進展について、病理学的及び生化学的側面からまとめている。急激なネフロン数の減少によって、残存ネフロンに対する負荷が増大し、単位ネフロンあたりの糸球体濾過速度上昇に伴って、糸球体や尿細管の拡張が観察される。各群 4 例を用いて近位尿細管を単離し、マイクロアレイ解析を行った (Fig. 12)。得られた結果について Gene ontology を調べたところ、術後早期の代償性腎不全期では細胞増殖に関連する遺伝子群の発現亢進が明らかとなった。

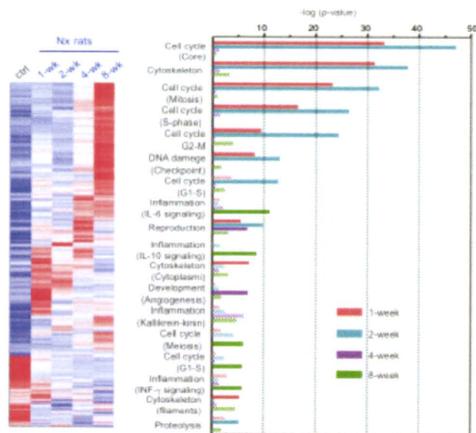


Fig. 12. 5/6腎摘出 (Nx) ラット単離近位尿細管における遺伝子発現プロファイルの経時的な変化。

・代償性腎不全期における細胞周期関連遺伝子の重要性

まず、ヒトにおける代償性腎不全期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、これらの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. 13. 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

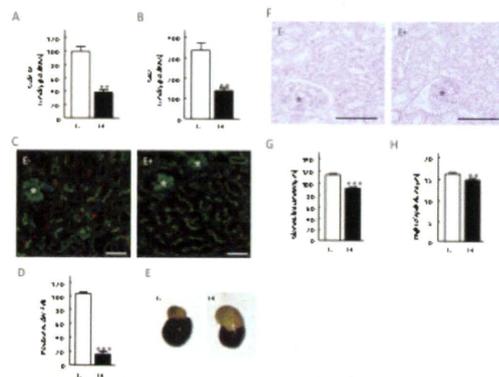


Fig. 13. mTOR阻害薬エベロリムス投与による代償反応の抑制とそれに基づく腎組織肥大の抑制。エベロリムス投与によって、その下流に位置するCyclin B2 (A)やCdc2 (B)のmRNA発現量は低下、Ki67をマーカーとする分裂細胞数の低下 (C, D)、腎組織肥大の抑制 (E)が認められる。さらに、腎病理切片 (F) では、糸球体径 (G) および尿細管上皮細胞の丈 (H) も抑制されることが示された。

大も抑制されている。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. 14)。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、

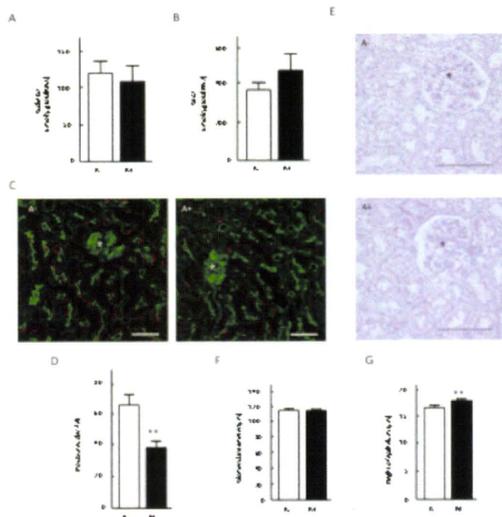


Fig. 14. Cdc2阻害薬CE-ALP投与による代償反応の抑制効果。
CE-ALP投与によって、Cyclin B2 (A)やCdc2 (B)のmRNA発現量は変化しないものの、Ki67をマーカーとする分裂細胞数は約半数に低下 (C, D) した。一方、腎病理切片 (F) では、糸球体径 (G) および尿細管上皮細胞の丈 (H) の大きな変化は認められず、尿細管上皮細胞については細胞分裂ができずに細胞個々の肥大化に繋がることが示された。

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. 15)。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。

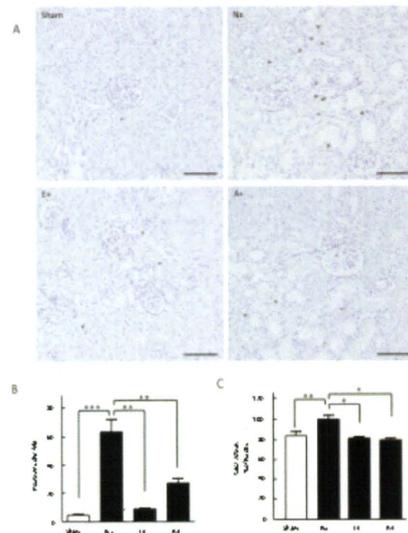


Fig. 15. mTOR阻害薬エベロリムス並びにCdc2阻害薬CE-ALP投与によるM期細胞数の減少。
M期細胞のマーカーとして知られるリン酸化Histon H3を指標として、分裂細胞数の変化を調べた結果 (A)、エベロリムス及びCE-ALPの処置によって、著しい細胞分裂の抑制が引き起こされることが認められ、同時に細胞溶解液におけるCdc2活性の抑制も確認された。

・末期腎不全時における mTOR 経路の重要性に関する検討

近年、進行性の腎障害である糖尿病性腎症や多発性嚢胞腎の病態進展過程で、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介したシグナル伝達経路が活性化すること、mTOR 阻害薬がこれらの疾患に対して著効することが示されている。現在 mTOR 阻害薬は免疫抑制薬また抗腫瘍薬として開発されているものの、末期腎不全などの組織繊維化に対する有効性については未解明である。本研究では、末期腎不全モデルラットに於いて、特に近位尿細管における強い mTOR シグナル経路の活性化

を見いだすことができた。これまで、糸球体メサンギウム細胞における活性化など知られてきたが、近位尿細管における機能については全くの未知であった。そこで、mTOR 阻害薬として唯一本邦に於いて使用可能なエベロリムスを用いた検討を進めた。その結果、5/6 腎摘出 8 週目より 2 週間エベロリムスを皮下投与した結果、近位尿細管におけるリン酸化 mTOR (P-mTOR) レベルの著明な減少と浸潤リンパ球のマーカーである ED1 や組織繊維化のマーカーである alpha-SMA の減少が観察された (Fig. 16.)。

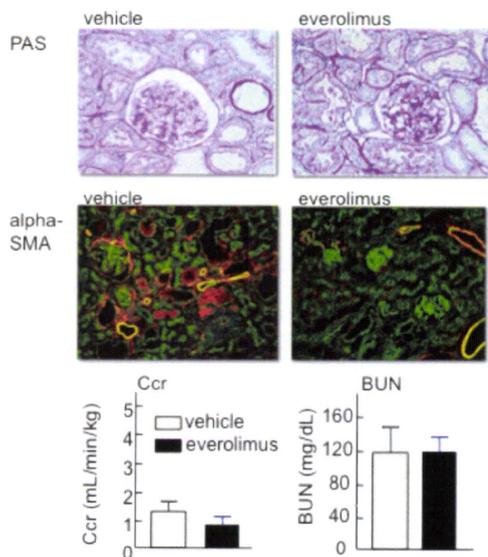


Fig. 16. 5/6腎摘出ラット（術後8週目）へのエベロリムス投与による腎繊維化の軽減効果。Ccr、BUNなど糸球体機能は不変であるが、糸球体の肥大が抑制され、alpha-SMAが減少。

さらに、尿中アルブミンレベルが約30%にまで低下すること、ほぼ検出不可能なレベルまで低下していた近位尿細管上皮細胞の薬物トランスポータの発現が回復傾向にあることが新たに明ら

かとなった (Fig. 17)。一方、末期腎不全時における mTOR 阻害薬の処置は、クレアチニンクリアランスやBUNに代表される糸球体機能には全く変化を及ぼさなかった。

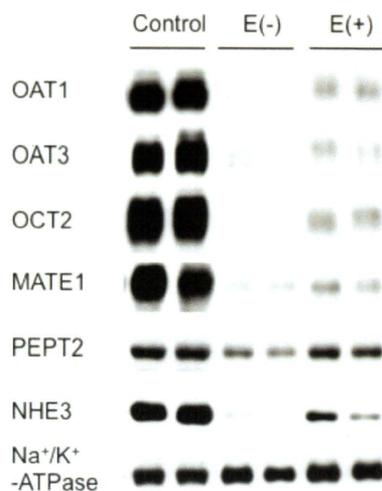


Fig. 17. 5/6腎摘出ラットにおけるエベロリムス投与による尿細管トランスポータタンパク質の発現回復傾向。

これら近位尿細管における病変進展阻止に mTOR 阻害薬が機能し、結果的に尿細管機能の回復に繋がると想定し、蛍光標識アルブミンの腎挙動について検討を加えた。FITC 標識したヒトアルブミンを静脈内投与し、20 分後に組織を固定、観察した。その結果、エベロリムス投与群ではコントロール群に比べて近位尿細管における FITC シグナルの著明な亢進（再吸収能の回復）が観察された (Fig. 18)。

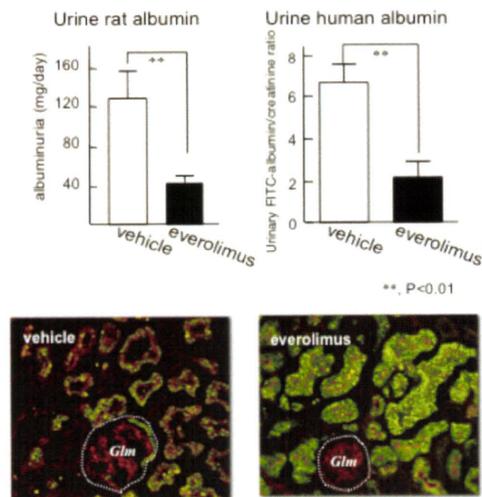


Fig. 18. 5/6腎摘出ラットにおけるアルブミン尿のエベロリムスによる軽減効果および近位尿細管における再吸収能の回復。

(3) 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

分担研究者深津の協力により、研究機関を通して 53 例の腎生検組織及び早朝第二尿の提供を受けることができた。Fig. 19 に示すように、18S RNA 及び 28S RNA のシグナル強度と、その間の非特異的なピークが存在しないことなどヒト腎生検組織より抽出した total RNA は微量であるが良質であることが示された。一方、抽出した total RNA の内、4 例分についてはクオリティチェックの段階で脱落したため、最終的にマイクロアレイ解析を実施できたのは 49 例であった。

次に、本 total RNA をラベル化、マイクロアレイ解析を行ったところ、32000 プローブの内、約 9500 プローブを有意

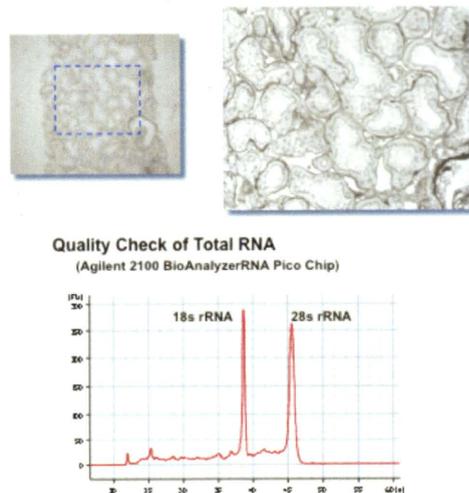


Fig. 19. ヒト腎生検組織の病理写真の例。糸球体は1個認められること、ほぼ近位尿細管が大部分を占めることが認められる。本組織片より抽出したtotal RNAのクオリティーチェックでは、マイクロアレイ解析に十分な質と量のtotal RNAが得られていることが認められた。

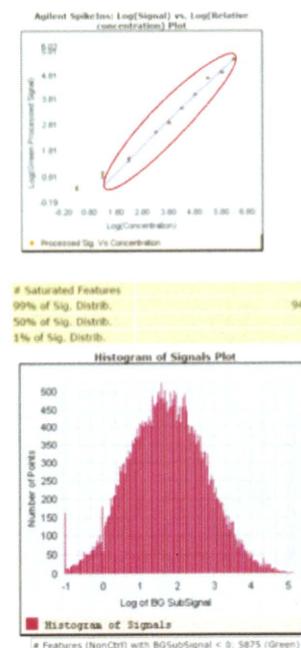


Fig. 20. ヒト腎生検組織由来total RNAを用いたマイクロアレイ解析の一例。約9500遺伝子の検出が可能であり、ヒト腎生検組織における遺伝子変化の解析は可能である。

に検出可能であることが判明した。すなわち、ヒト腎生検組織など微量検体由来の total RNA においても本解析系においては十分に使用可能であることが示された (Fig. 20)。