

そこで、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 4 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病変の診断目的の余剰分である。従って、殆どの患

Table 4. 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

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、或いは腎病

変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。

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

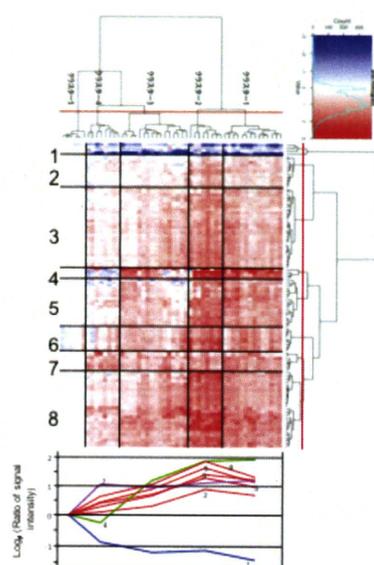


Fig. 21. ヒト腎生検組織を用いて得られたトランスクリプトームデータのヒートマップ (横軸：疾患クラスター；縦軸：遺伝子クラスター)

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. 21 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。

(4) ラットシスプラチン腎症モデルを用いた薬剤性腎障害のマーカー探索

シスプラチンは、肺がんをはじめ最も広く用いられる抗腫瘍薬であり、骨髄抑制が弱い事が特徴としてあげられている。一方、シスプラチンの用量規制因子は腎毒性であることから、殆ど入院治療及び多量の補液（ハイドレーション）による腎保護作用を狙った手順が用いられるが、十分な効果を発揮していない。また、シスプラチンは近位尿細管側底膜に発現する有機カチオントランスポータ OCT2 によって濃縮的に近位尿細管上皮細胞に集積する。

従って、一般的な腎機能マーカーである血清クレアチニン値（Scr）や血中尿素窒素値（BUN）の変化に先だって近位尿細管障害に深く関連するマーカーの変化が想定されるが、未だに不明である。これらの背景により、先ずラットを用いてシスプラチン投与による近位尿細管障害を反映する分子の探索を試みた。ラットに低用量（2mg/kg）と高用量（10mg/kg）のシスプラチンを腹腔内投与し、2日目の近位尿細管を20mm単離、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Table 5 にまとめたように、サイトカイン、ケモカインなど炎

Table 5. シスプラチン腎症ラットの単離近位尿細管（Tubule）または全腎組織（Whole）を用いたマイクロアレイ解析によって見出されたシスプラチン投与によって発現変化を示す遺伝子

Gene Name	Tubule				Whole	
	2 mg/kg Cisplatin		10 mg/kg Cisplatin		10 mg/kg Cisplatin	
	log ₂ (ratio)	P value	log ₂ (ratio)	P value	log ₂ (ratio)	P value
ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0.04	0.89	-1.56	0.01	N.D.	
artemin	0.02	0.96	0.13	0.74	N.D.	
bone morphogenetic protein 3	N.D.		N.D.		-2.31	0.23
chemokine (C-C motif) ligand 2	N.D.		3.22	<0.01	1.75	0.01
chemokine (C-C motif) ligand 3	1.10	0.30	N.D.		N.D.	
chemokine (C-C motif) ligand 4	-0.08	0.81	-0.01	0.96	-0.14	0.62
chemokine (C-C motif) ligand 5	0.27	0.52	-0.31	0.22	-0.87	0.01
chemokine (C-C motif) ligand 6	-0.63	0.26	0.17	0.69	0.66	0.03
chemokine (C-C motif) ligand 12	-0.33	0.57	-0.38	0.46	-0.19	0.62
chemokine (C-C motif) ligand 17	N.D.		N.D.		1.68	<0.01
chemokine (C-C motif) ligand 19	0.35	0.49	2.82	0.02	3.32	0.02
chemokine (C-C motif) ligand 24	-0.41	0.40	-0.47	0.31	-0.13	0.75
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	N.D.		2.46	0.02	N.D.	
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	0.14	0.63	-0.89	0.14	N.D.	
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	0.09	0.89	2.70	0.08	2.05	0.04
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	0.20	0.72	-0.18	0.81	0.20	0.52
cysteine rich protein 61	0.23	0.68	1.30	0.07	1.45	0.11
diphtheria toxin receptor	N.D.		3.98	0.02	3.35	0.00

epidermal growth factor	-0.54	0.36	-2.40	0.04	-3.26	0.02
endothelial cell-specific molecule 1	-0.21	0.56	-0.19	0.66	-1.32	0.03
fibroblast growth factor 1	-0.10	0.74	-1.08	0.05	-0.30	0.52
fibroblast growth factor 9	0.63	<0.01	-1.42	<0.01	-0.97	0.07
fibroblast growth factor 10	0.72	0.44	N.D.		N.D.	
fibroblast growth factor 13	0.74	0.15	-1.13	0.03	N.D.	
growth differentiation factor 1	0.09	0.81	-0.08	0.86	-0.21	0.55
growth differentiation factor 6	-0.29	0.63	-0.71	0.24	N.D.	
granulin	0.25	0.34	-0.19	0.59	0.19	0.40
hepatoma-derived growth factor	0.57	0.53	0.78	0.39	N.D.	
insulin-like growth factor 1	-0.93	0.37	-1.45	0.24	-1.79	0.04
insulin-like growth factor 2	N.D.		N.D.		0.86	0.12
IK cytokine	0.05	0.89	0.76	0.17	0.69	0.16
interleukin 1 alpha	-0.27	0.77	-0.68	0.52	-1.48	0.16
interleukin 1 beta	1.42	0.19	2.52	0.02	0.92	0.15
interleukin 13	-0.76	0.08	-0.13	0.79	N.D.	
interleukin 15	0.37	0.12	-0.68	0.09	-0.28	0.43
interleukin 16	0.09	0.69	-0.58	0.08	-0.11	0.74
interleukin 1 receptor antagonist	0.54	0.24	0.66	0.25	N.D.	
inhibin beta C	-0.46	0.10	-0.79	0.04	0.82	0.02
insulin 1	-0.13	0.72	0.27	0.43	0.68	0.28
leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-0.41	0.49	-2.67	0.01	N.D.	
midkine	-0.18	0.54	0.59	0.18	0.88	0.10
melanoma inhibitory activity 2	0.37	0.42	-1.25	0.03	0.28	0.62
macrophage migration inhibitory factor	-0.42	0.29	-0.94	0.07	-0.26	0.54
neuregulin 1	0.70	0.26	1.40	0.14	-2.94	<0.01
neuregulin 2	0.21	0.71	0.13	0.77	0.56	0.07
pre-B-cell colony enhancing factor 1	0.41	0.24	0.86	0.04	0.92	0.03
platelet derived growth factor, alpha	-0.41	0.16	1.51	0.01	0.67	0.10
platelet-derived growth factor, C polypeptide	1.34	0.04	-2.00	0.01	N.D.	
pleiotrophin	-1.30	0.31	-0.22	0.81	0.63	0.30
associated molecule with the SH3 domain of STAM	0.23	0.50	-0.77	0.08	-1.03	0.01
transforming growth factor, beta 1	N.D.		N.D.		N.D.	
transforming growth factor, beta 2	-0.19	0.23	-1.36	0.03	N.D.	
tumor necrosis factor superfamily, member 2	N.D.		N.D.		N.D.	
vascular endothelial growth factor C	-1.43	0.04	-1.20	0.06	N.D.	

症反応に関連する遺伝子の上昇が認められた。

これらの中で、CCL2 (MCP-1) に着目し、以降の検討を行った。まず、ラ

ットシスプラチン腎症において MCP-1 発現の局在について検討した結果、予想されたとおり、MCP-1 の発現は近位尿管選択的であった (Fig. 22)。一方、

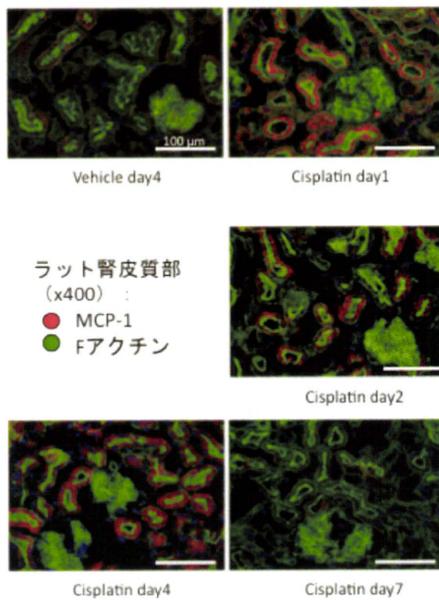


Fig. 22. ラット腎皮質部分におけるMCP-1の局在。

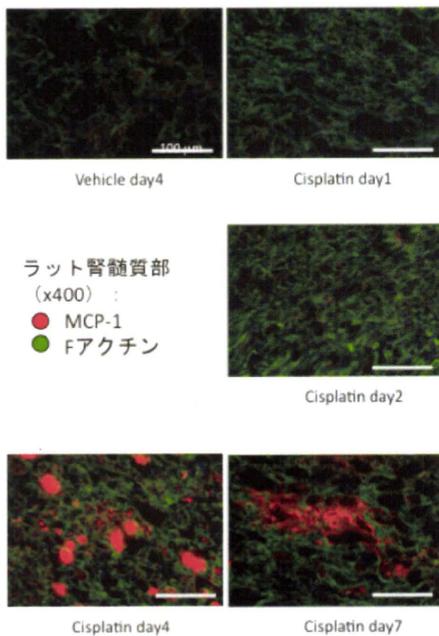


Fig. 23. ラット腎髄質部分におけるMCP-1の局在。

腎髄質においては間質に強く染まることも認められた (Fig. 23)。また、AKIのマーカーとして Bonventre 教授が発見、展開している Kim-1 について近位尿細管障害を反映するマーカータンパク質

の陽性コントロールとして比較検討した。その結果、単離近位尿細管及び全腎組織を用いた mRNA 発現レベルの経時変化では、全腎組織の MCP-1 発現はシスプラチン投与直後に一端減少するのに対し、Kim-1 の発現量は上昇し続けた。一方、単離近位尿細管を試料とした場合では、MCP-1 の発現量は Kim-1 と同様に上昇し続けた (Fig. 24)。

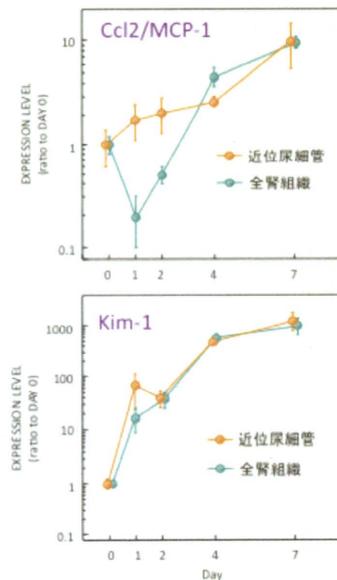


Fig. 24. シスプラチン投与後のラット単離近位尿細管及び全腎組織におけるMCP-1、Kim-1 mRNA発現量の推移。

さらに、ラット尿を用いて尿中バイオマーカーとしての MCP-1 の有用性について、Kim-1 を対照に比較検討した結果、尿中の MCP-1 はシスプラチン投与直後から上昇しはじめ、血漿中のクレアチニンやBUNの上昇が認められる数日前に既に上昇を示すこと、シスプラチン投与翌日には既にコントロールラットの3倍値となっていることが判明した (Fig. 25)。シスプラチン投与7日

目、腎組織病変が回復傾向にある中において、尿中の Kim-1 は変化を示さなかったが、MCP-1 は組織の病変に応じて低下傾向を示した。

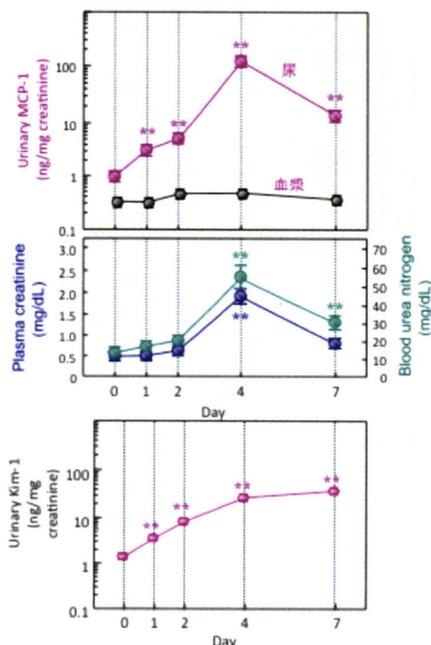


Fig. 25. シスプラチン投与後のラット尿における MCP-1 と Kim-1 の検出。 ** P<0.01 vs Day 0

・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、重篤な病状を示す事例の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負荷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。Fig. 26 に示す様に、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。

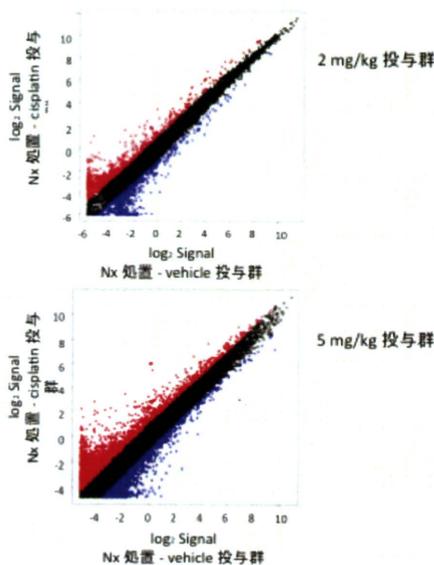


Fig. 26. 5/6腎摘出ラットに溶解液 (vehicle) またはシスプラチンを投与した後の単離近位尿細管におけるトランスクリプトームデータ

特に、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 (Table 5 に一部列挙)、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。得られたデータと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。Table 6 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。

これらの内、プローブ 2694 (CCL2) に加えてプローブ 32135 に着目し、特異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. 27 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った。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、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

Table 6. 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	シスプラチン	
	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

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. 28)。

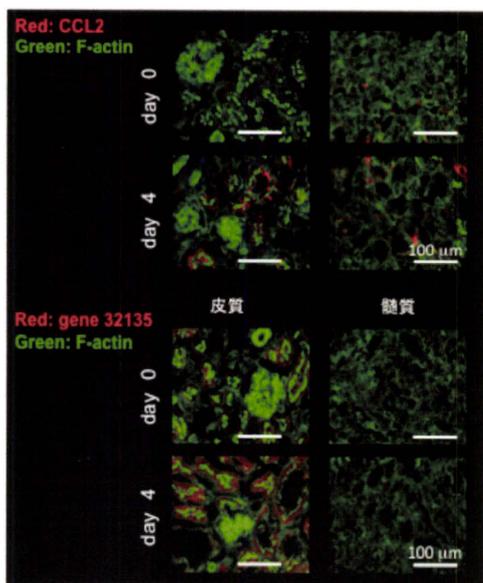


Fig. 27. 5/6腎摘出2週目のラットにシスプラチンを5mg/kg投与した後のCCL2、gene32135の発現

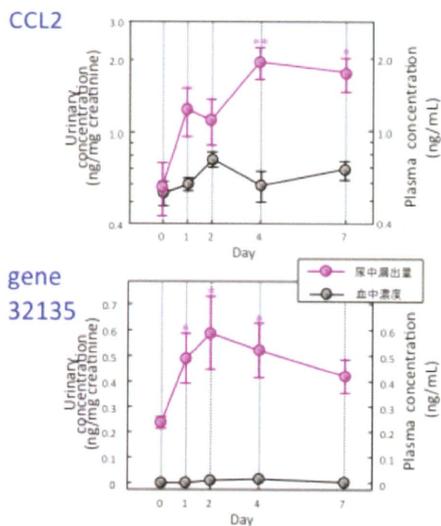


Fig. 28. 5/6腎摘出2週目のラットにシスプラチンを5mg/kg投与した後の血中または尿中のCCL2及びgene 32135産物の発現

(5) 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癌患者の中で、腎予備能を保持した患者にはシスプラチンを中心的抗腫瘍薬とした化学療法（レジメン）が選択される。多くの場合、投与量を調節し、大量の補液（ハイドレーション）を行うことによってシスプラチンの腎毒性発現を最小限にしようとする試みが為されてきた。一方、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癌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

Table 7a. ヒト尿を用いて調べたタンパク質リスト

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

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（測定原理は Fig. 8 を参照）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。Table 7a. (ELISA 法) 及び Table 7b. (サスペンションビーズアレイ法) それぞれに検討したタンパク質のリストを示す。

先ず、シスプラチンを投与された患者の中で、典型的な腎機能障害の推移をたどった症例を示す (Fig. 29)。その陰性対照として腎機能障害を示さないカルボプラチンを投与された症例を Fig. 30 に示す。Fig. 29 において、調べたタンパク質では概ね類似した経過を示した。この中で、尿中の MCP-1 は観察期間を通じて上昇し続けること、一方 KIM-1、L-FABP、N-GAL は投与直後の 3 日目に高濃度検出されたが、一端低下し再び上昇傾向を示すこと（オーバーシュート現象）が示された。検討した

Table 7b. ヒト尿を用いて調べたタンパク質リスト

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

殆どのバイオマーカータンパク質においては、血清クレアチニン値や BUN に比して鋭敏に反応することが明らかとなった。一方、カルボプラチンを投与

された患者においては、MCP-1 や KIM-1 について一端上昇傾向を示したものの時間と共に投与前レベルまで低下することが示された。

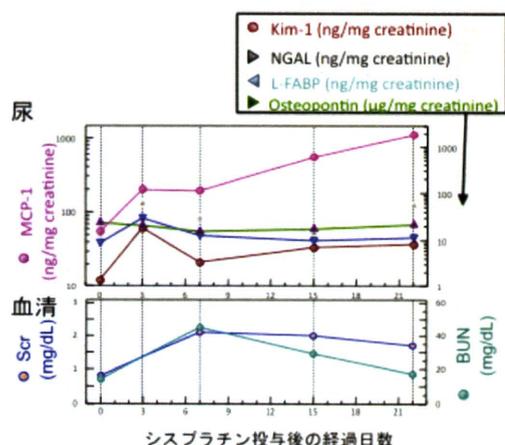


Fig. 29. シスプラチン投与後の尿中バイオマーカーの推移
70歳、男性、小細胞肺癌、化学療法レジメン：エトポシド/シスプラチン-アムルピシン

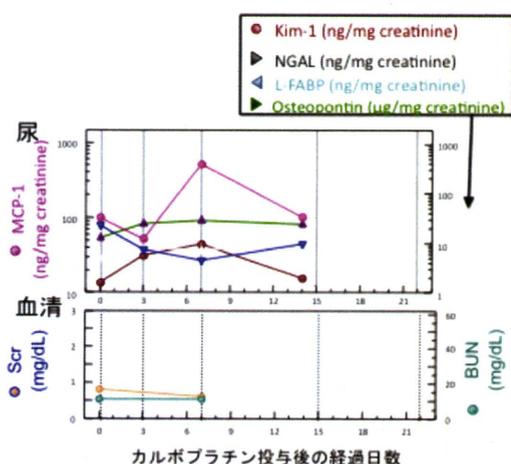


Fig. 30. カルボプラチン投与後の尿中バイオマーカーの推移
55歳、男性、肺癌、紡錘細胞がん、化学療法レジメン：パバシズマブ/パクリタキセル/カルボプラチン

これら典型的な2症例の結果に基づき、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癌患者とカルボプラチンを投与された肺癌患者を対象に、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. 31)。興

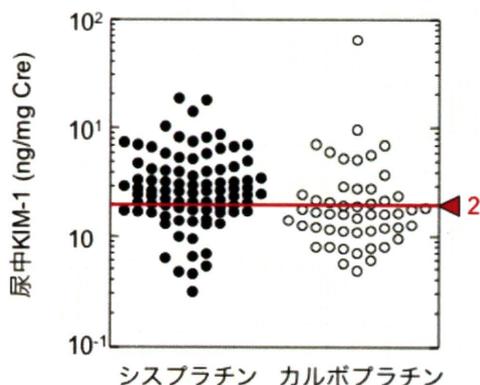


Fig. 31. シスプラチンまたはカルボプラチン投与後の尿中KIM-1濃度
投与前以外の全てのポイント (シスプラチン88点、カルボプラチン50点) 2ng/mg Creは、尿中KIM-1のgolden standard.

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

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. 32)、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. 33 & 34)。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。

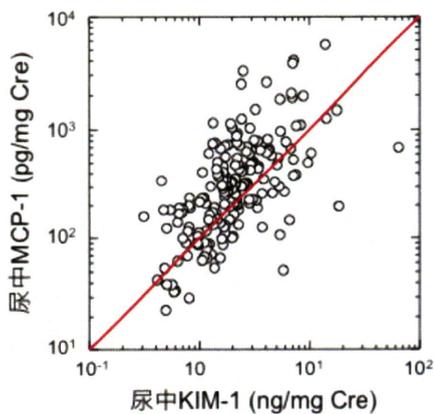


Fig. 32. 尿中のKIM-1とMCP-1との比較
投与前以外の全てのポイント (シスプラチン88点、カルボプラチン50点) を集計した結果を示す。r=0.620

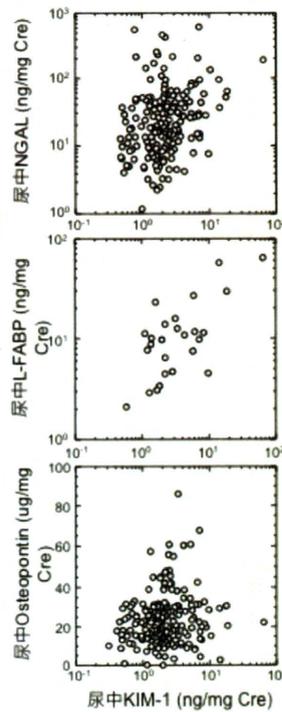


Fig. 33. 尿中におけるKIM-1とNGAL、L-FABP、オステオポンチンとの比較

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。

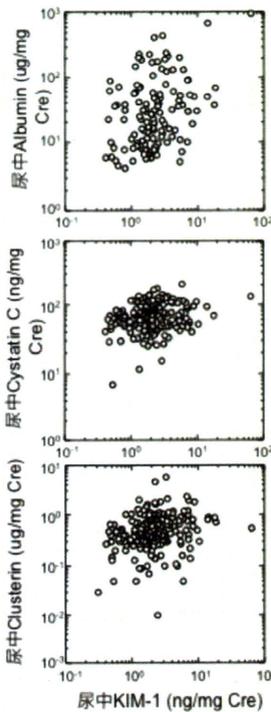


Fig. 34. 尿中におけるKIM-1とアルブミン、シスタチンC、クラスタリンとの比較

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。

さらに、AKIに加えて尿中バイオマーカーの慢性腎臓病患者における位置づけについても調べた。すなわち、腎生検組織によるトランスクリプトーム解析を実施した症例の一部における

種々尿中バイオマーカーの濃度と病態との比較解析を行った結果、Fig. 35.および Fig. 36.に示すように原発性慢性腎

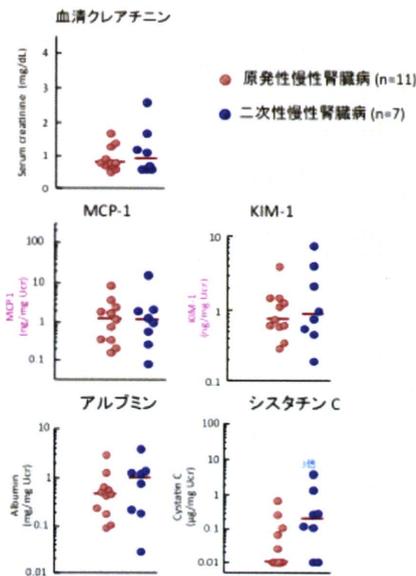


Fig. 35. CKD患者における各種尿中バイオマーカーの検出

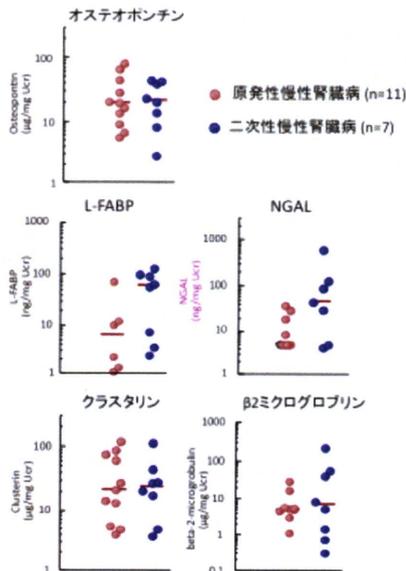


Fig. 36. CKD患者における各種尿中バイオマーカーの検出

臓病及び糖尿病性腎症など二次性の慢性腎臓病患者の尿では、これらバイオ

マーカータンパク質が強く表れる傾向にあることが観察された。

(6) ヒト腎生検組織のスコアリング

現時点で収集した 53 例の腎生検組織の原疾患としては、IgA 腎症 (15 例)、膜性腎症 (7 例)、微小変化群 (4 例)、ループす腎炎 (4 例)、アミロイドーシス (3 例) などである。

腎生検入院中にインスリンクリアランスで GFR を測定し、尿タンパク量、尿中 NAG などを計測した。

病理組織標本の評価としては、以下のようなパラメーターを半定量した。

1) 糸球体硬化率 (硬化糸球体/糸球体数) : 糸球体硬化が尿細管間質に影響を与える (尿細管萎縮、線維化) ためその程度の指標とした。

2) 尿細管細胞障害 : グレード 0-4 細胞障害 (膨化、刷子縁剥離、細胞剥離) 全尿細管間質面積における障害部位の割合を評価 : 急性期に細胞障害の程度を評価

- 0 : 細胞障害 5%未満
- 1 : 5-10%
- 2 : 10-30%
- 3 : 30-50%
- 4 : 50%以上

3) 細胞浸潤 : 細胞浸潤のみられる部位の全尿細管間質に対する面積の割合
グレード 0-4 アレルギー性間質障害の診断と間質に及ぶ尿細管障害の程度をグレーディング (2 と同様)

4) 間質線維化 : 慢性期の腎病変の指標 (グレーディングは 2 と同様)

Fig. 37 には典型的な症例の腎生検組織像を示しており、上から細胞障害のグレードが 1、2、4 となっている。

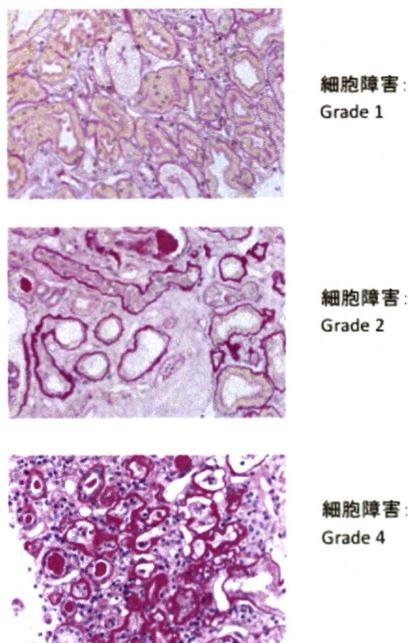


Fig. 37. CKD患者腎生検の病理像

各症例における 4 つのパラメーターの相関を Fig. 38 に示した。尿細管障害

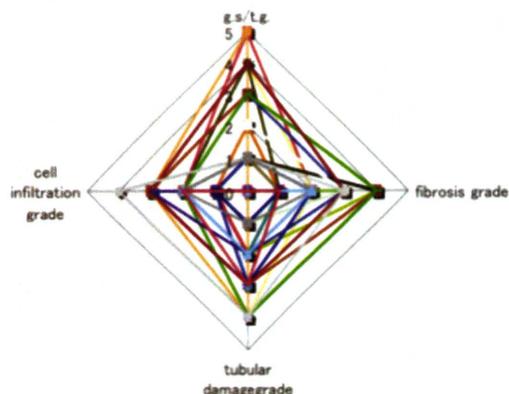


Fig. 38. 腎生検組織の病理評価を行った患者における糸球体硬化率 (g.s./t.g)、尿細管細胞障害 (tubular damage grade)、細胞浸潤 (cell infiltration grade)、間質繊維化 (fibrosis grade) の症例毎の相関解析

と細胞浸潤が高度で糸球体硬化が少ない症例ほど尿細管間質の障害が主体と考えられる。

D. 考察

腎機能低下患者においては、潜在的な薬剤性腎障害発症のリスクが高いことから、個々の腎機能に応じた薬物投与設計が求められる。多くの薬物が近位尿細管上皮細胞に蓄積されるものの、日常診療で用いられる腎機能の指標は血清クレアチニン値、BUN 値をはじめ糸球体濾過能を反映するものが殆どであり、近位尿細管機能、特に異物解毒を司る尿細管分泌機能の指標は殆ど知られていない。また、新薬の開発における毒性スクリーニングにおいても同様に、尿細管機能を反映するバイオマーカー「安全性バイオマーカー」の確立が望まれている。

腎臓は、約 10 種類の小器官より構成されるネフロンを最小機能単位としており、ヒトでは左右それぞれに 100 万个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、髄質も含まれたいわゆる 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 (Fig. 39)、解析に用いる組織によって遺伝子発現データは大きく異なるため、研究者間における再現性に乏しいという問題があった。

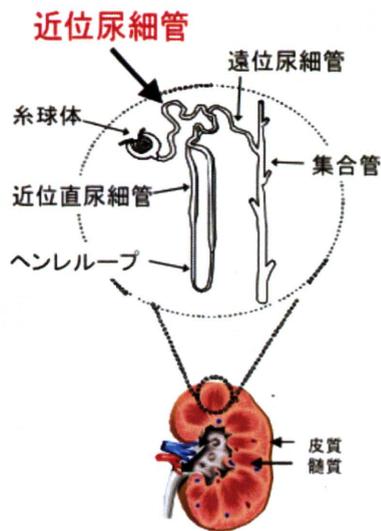


Fig. 39. 腎臓の構造と最小機能単位ネフロン

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. 40)。

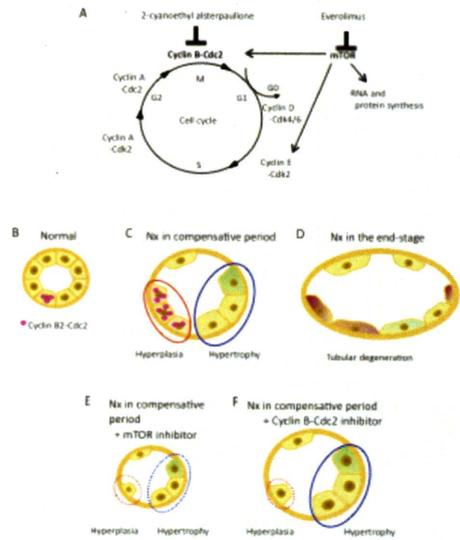


Fig. 40. 代償性腎不全期におけるM期調節因子の役割。M期において特異的に機能するCyclin B2やCdc2は、代償性腎不全期における上皮細胞補完並びに再生の鍵因子として見出された。これらの機能を阻害するmTOR阻害薬やCdc2阻害薬は、上皮細胞の補完の障害に繋がり、腎組織肥大抑制を示した。

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 (Tables 5, 6)。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。今回ラットモデルで見出された 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. 24)。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、全腎組織では低下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. 22 と Fig. 23 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. 25)、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. 21)。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. 41)。その結果、Osteopontin、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

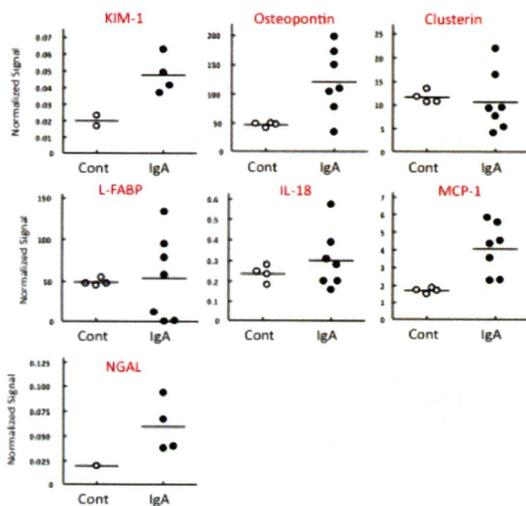


Fig. 41. IgA腎症の患者腎生検組織中における種々バイオマーカーmRNAの検出。 IgA腎症患者 (n=7) 由来の腎生検組織をマイクロアレイ解析し、得られたデータの中からバイオマーカー関連遺伝子の発現レベルを抽出した。KIM-1のように7例中4例のみ数値として検出されたモノもあったが、MCP-1は全ての症例で検出された。

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。Fig. 42 に示す様に、慢性腎臓病患者における急性腎不全の発症という経験は、寛解するか否かに拘わらず将来的な末期腎不全へと加速する危険因子であることが示されている。この報告は、当初より申請者が主張していた入院患者の特に腎機能低下患者における薬剤性腎障害発症の危険性を裏付けるものである。特に、腎近位尿細管上皮細胞には、イオン性薬物の濃縮的な細胞内取り込みを媒介する薬物トランスポーターが抱負に発現している

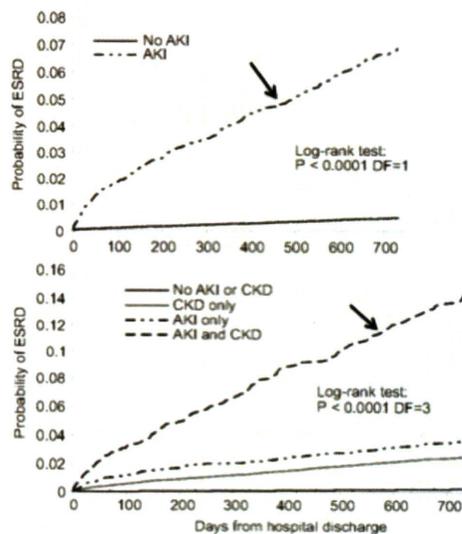


Fig. 42.慢性腎臓病 (CKD) の高齢者における急性腎不全 (AKI) の既往は、末期腎不全 (ESRF, end-stage renal failure) への進展を加速する重要な危険因子である (矢印: ハザード比41.2)。 Ishani A et al. *J Am Soc Nephrol* 20: 223 (2009)より引用

(Fig. 43)。従って、薬物トランスポータを介した細胞内薬物濃度の上昇に伴って、上皮細胞由来の様々な分子が尿中に漏出することにより、早期バイオマーカーとして有用であることが予想

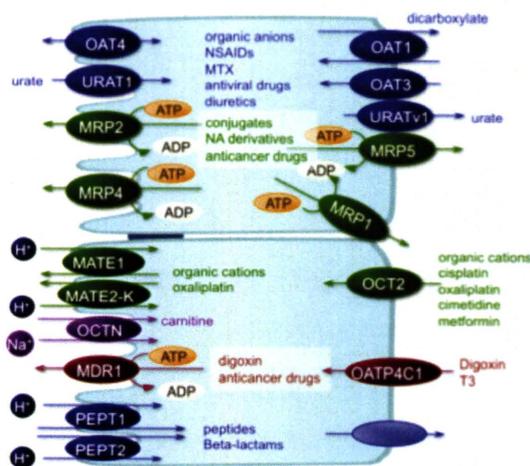


Fig. 43. ヒト腎近位尿細管上皮細胞に発現する薬物トランスポータ

OAT, organic anion transporter; OCT, organic cation transporter; MRP, multidrug resistance associated protein; URAT, uric acid transporter; MATE, multidrug and toxin extrusion; OCTN, organic cation-carnitine transporter; PEPT, proton-coupled peptide transporter; MDR, multidrug resistance; OATP, organic anion transporting polypeptide

される。近年、多くの研究者が熾烈な競争下において尿中バイオマーカーの探索、同定、臨床応用といった様々な段階の研究を発表しつつある。一方、多くの場合、施設間における再現性に乏しいため、実地診療における有用性に疑問が残る。今後は、本研究において見出された MCP-1 をはじめいくつかの分子について、日本国内のみならず、広く海外も視野に入れて臨床研究を展開し、安全性バイオマーカーとしての有用性について明確にしたいと考える。

上記の結果から、薬物に選択的なバイオマーカーを同定し、これまで見出されてきたバイオマーカー分子と総合的に扱う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。

E. 結論

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。さらに、腎機能低下ラットに低用量、中用量のシスプラチンを負荷することによって、MCP-1 に加えて新規遺伝子産物

が薬剤性腎障害に特異的な尿中バイオマーカーに成り得ることを見出した。同時に、肺がん患者由来尿検体、生体肝移植患者由来の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やタクロリムス腎症を検出するための有望な尿中バイオマーカーであることが強く示唆された。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 49 例実施し、慢性腎臓病の発症と進展に関わる遺伝子セットの抽出を行った。以上、当初の計画に従った検討を進め、目標としていた薬剤性腎障害に特異的かつ高感度な非侵襲 (尿中) バイオマーカーの特定と臨床応用の可能性まで進めることが出来た。

F. 健康危険情報

特にない。

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). Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, Saito T, Kohda, Y, Nishi, S, Tsuruya K., Kiyomoto, H, Iida H, Sasaki T, Higuchi M, Hattori M, Oka K, Kagami S, Nagata M, Kawamura T, Honda M, Fukasawa Y, Fukatsu A, Morozumi K, Yoshikawa N, Yuzawa Y, Matsuo S, Kiyohara Y, Joh, K, Taguchi T, Makino H, Committee for Standardization of Renal Pathological Diagnosis and Working Group for Renal Biopsy Database; Japanese Society of Nephrology, Tokyo, Japan: Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan. *Clin Exp Nephrol* Mar 25 (2011).[Epub ahead of print]
- (3). Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T: Activation of Src Mediates PDGF-Induced Smad1 Phosphorylation and Contributes to the Progression of Glomerulosclerosis in Glomerulonephritis. *PloS One* 6: 3, e17929 (2011).
- (4). 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).
- (5). 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).
- (6). 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).
- (7). 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).
- (8). 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).
- (9). 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).
- (10). 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).
- (11). 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).
- (12). 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).
- (13). 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).
- (14). 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).
- (15). Motoko Yanagita: Antagonists of bone morphogenetic proteins in kidney diseases. *Curr Opin Invest Drugs* 11: 3, 315-22 (2010).
- (16). 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)
- (17). 深津敦司:『透析療法の選択について ひとこと-腹膜透析か血液透析か』、臨牀透析26: 5, 509-510 (2010)

- (18). 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).
- (19). 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).
- (20). 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).
- (21). 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).
- (22). 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).
- (23). 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).
- (24). 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).
- (25). 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).
- (26). 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).
- (27). 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).
- (28). 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).
- (29). 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).
- (30). 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).
- (31). 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^{T2} *J Immunol* 182: 9, 5633-5640 (2009)
- (32). 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)
- (33). Motoko Yanagita: BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression *Biofactors* 35: 2, 113-119 (2009)
- (34). Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, Iwano J, Katsura T, Fukatsu A, Doi T & Inui K: Identification of multidrug