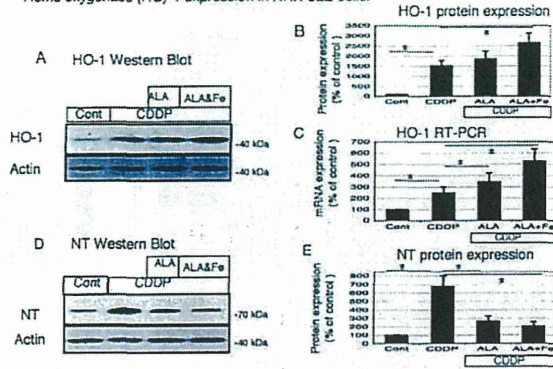
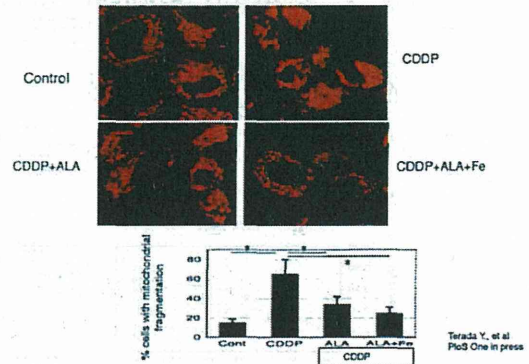


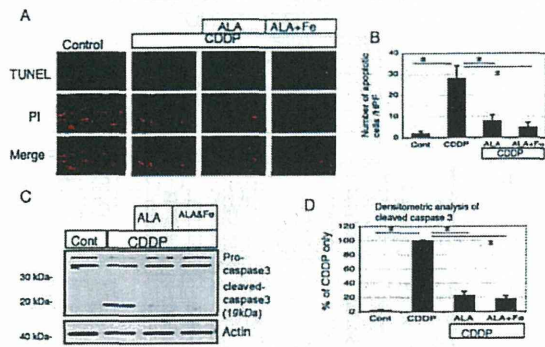
Protective effects of ALA+Fe to cisplatin-induced oxidative stress and induction of Heme oxygenase (HO)-1 expression in NRK-52E cells.



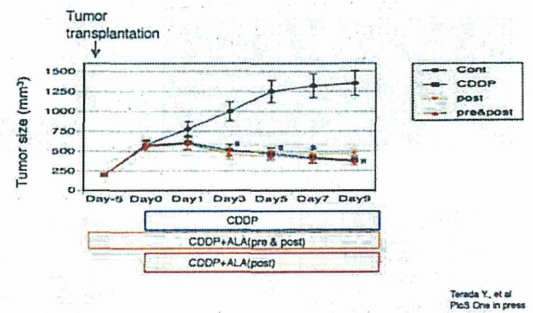
ALA and Fe prevent cisplatin-induced damage of mitochondrial structure in NRK-52E cells.



TUNEL assay and cleaved caspase 3 to evaluate apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin and ALA+Fe



Effects of ALA on anti-tumorigenic effects of cisplatin in vivo.



薬剤性腎障害の早期発見のバイオマーカーと新規治療法の開発

1. AKIのバイオマーカーの測定系
2. ALAのAKI治療薬としての可能性
Mitochondrial Enzymes & HO-1
3. 薬剤性腎障害のメカニズムと新規治療法の解明

薬剤性腎障害の発症機序： 特にメガリンを介する機序について

新潟大学医歯学総合研究科 機能分子医学講座

斎藤亮彦

薬剤性腎障害

糸球体障害 / 尿管障害

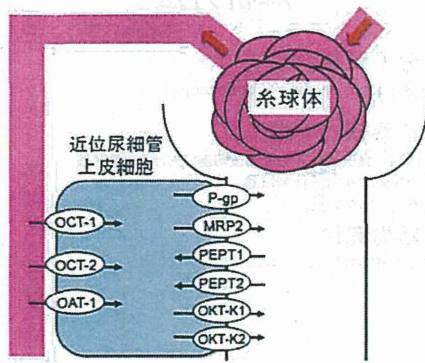
蛋白尿(ネフローゼ)型 / 腎機能低下型

免疫学的機序 / 中毒性機序

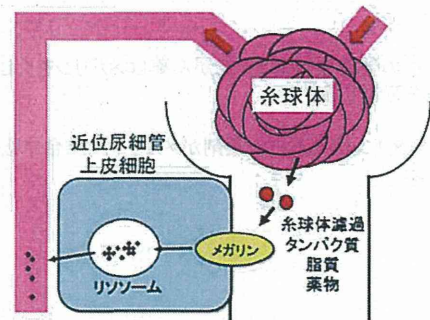
抗菌薬・抗がん薬

免疫抑制薬？ 造影剤？

近位尿管上皮細胞の薬物輸送体



近位尿管上皮細胞エンドサイトーシス受容体 メガリン (Megalin)



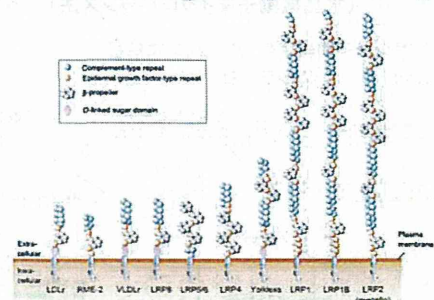
Saito A, et al. PNAS 1994

Evidence that Epithelial Glycoprotein 330/Megalin Mediates Uptake of Polybasic Drugs

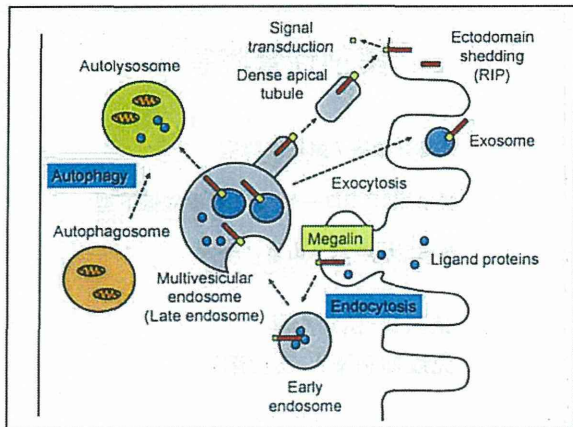
Moestrup, SP et al. J.Clin.Invest. 1995. 96:1404-1413

Aprotinin
Aminoglycosides → Megalin
Polymyxin B

The LDL receptor gene family



Willnow TE and Nykjaer A, Mol Cell Endocrinol 2010



シラスタチン

デヒドロペプターゼ-I (DHP-I) 阻害薬

イミベネムは近位尿管上皮細胞に局在するDHP-Iにより水解されると(腎への取り込みが増し?)腎傷害性を惹起するとされており、この水解を抑制するために腎DHP-Iの特異的な阻害薬であるシラスタチンナトリウムが配合されている。

シラスタチンの同時投与でイミベネムの尿中排泄が増加する(Verpooten GA, et al. Br J Clin Pharmacol 18: 183-193, 1984)。

Organic anion transporter (OAT) 阻害薬

Takeda M, et al. Eur J Pharmacol 419: 113-120, 2001

Enomoto A, et al. JASN 13: 1711-1720, 2002

バンコマイシン、シスプラチンなどの腎障害も軽減するという報告がある。しかしこれらの薬物はカチオン性。

作業仮説

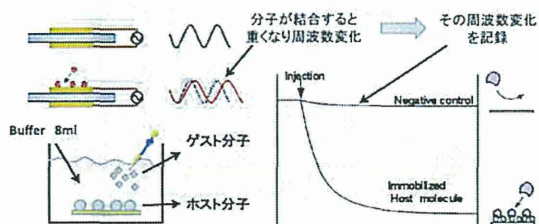
- 1)ある種の腎毒性抗菌薬・抗がん薬はメガリンを介して腎毒性を惹起する。
- 2) シラスタチンはそれらの薬剤がメガリンに結合するのを阻害する。

解析方法

- 分子間結合解析
QCM (quartz crystal microbalance)
- 培養細胞実験
DHP-I非発現近位尿管上皮細胞における毒性試験
シラスタチンによる抑制試験
メガリンノックダウン
- 動物実験
メガリンKOマウスの利用

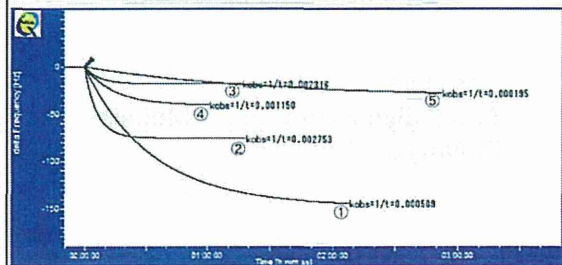
QCM (quartz crystal microbalance) (水晶振動子マイクロバランス法)

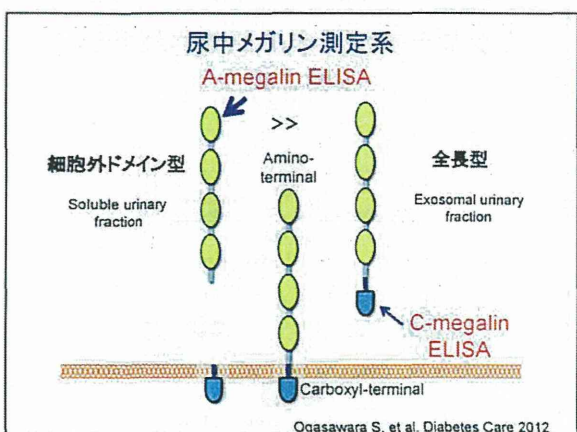
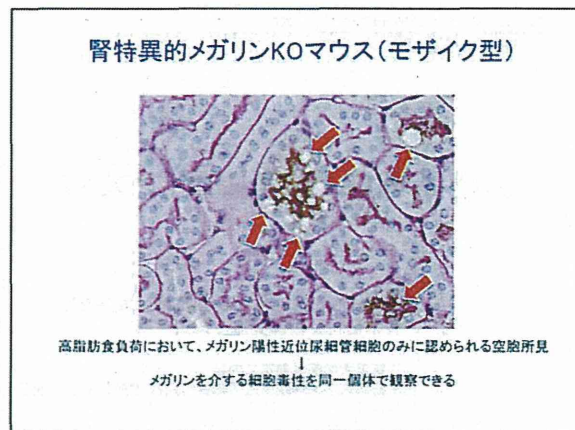
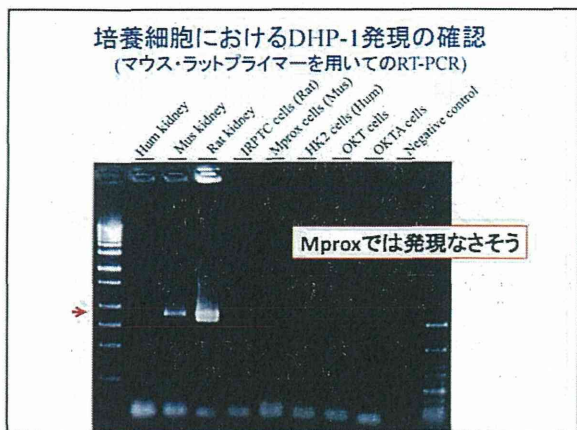
- 微量の分子間結合をリアルタイムに解析
- AffinixQ™ (イニシウム社)



シラスタチンによるコリスチンのメガリン結合抑制

シラスタチンを①投与なし、②800μg、③1600μg、④4000μg、⑤10000μg投与した後、コリスチン240μg (30mg/ml, 8μl)を投与





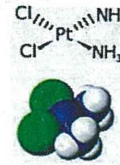
抗癌薬等による腎障害について

各務博¹、庄子聡¹、五十嵐夏恵¹、堀好寿¹、
青木信将¹、齋藤亮彦²、成田一衛¹

¹新潟大学医学部第二内科
²新潟大学大学院医歯学総合研究科 機能分子医学講座

到達目標

CKD患者に対して安全な シスプラチン投与を可能とする



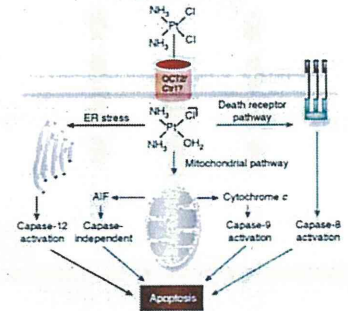
$\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$
分子量 300.05
血漿タンパク結合 98%
半減期 20-30分
尿中排泄

背景 1

- シスプラチンは、1845年に初めて合成され、1983年日本において抗癌剤として承認された。
- 胚細胞腫瘍、卵巣がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌などにおいて今なお生存期間延長に寄与するkey drugと考えられている。
- シスプラチンの主な副作用には悪心・嘔吐、腎障害、聴力障害であり、用量規定毒性は腎障害である。
- シスプラチン腎症予防の基本は大量輸液・大量利尿であり、CCr 60ml/min未満では安全な投与が難しいとされている

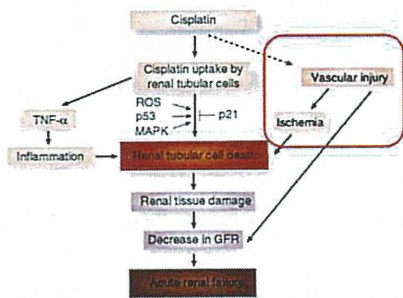
1. Pignon JP et al, J Clin Oncol, 2008. 2. Ardizzone A et al, J Natl Cancer Inst, 2007.
3. Rossi A et al, Cancer Treat Rev, 2013. 4. Voelzang BN et al, J Clin Oncol, 2003.

シスプラチン腎症の想定されている メカニズム



N Pahl et al., Kidney International (2008) 73, 994-1007, doi:10.1038/sj.ki.5002786.

シスプラチン腎症の想定されている メカニズム



N Pahl et al., Kidney International (2008) 73, 994-1007, doi:10.1038/sj.ki.5002786.

シスプラチン腎症発症と CKD危険因子

目的

- CKDに關与する危険因子がシスプラチン腎症発症に与える影響を明らかとする

患者と方法

- 2006~2012年に当科において胸部悪性腫瘍に対してシスプラチン併用化学療法を受けた84症例についてレトロスペクティブに検討した

Acute kidney injury (AKI) は以下の定義を用いた;

Reduction of eGFR > 25%
or
Increased serum-creatinine (sCre) x 1.5 times
or
Increased sCre > 0.3 mg/dl

at anytime during evaluation period.

シスプラチン投与プロトコルモデル

Route 1		Route 2	
5 hr	Lactate Ringer's solution 1000ml Magnesium sulfate 20mEq Metoclopramide 20mg	2 hr	Maintenance solution 500ml
		30 min	Saline solution 100ml Palonosetron 0.75mg Dexamethasone 9.9mg
		10 min	Saline solution 100ml Pemetrexed
		30min	Saline solution 100ml
2 hr	Mannitol 300ml	2 hr	Lactate Ringer's solution 250ml Cisplatin
2 hr	Maintenance solution 500ml	5 hr	Lactate Ringer's solution 1000ml Magnesium sulfate 20mEq Metoclopramide 20mg
Total 3850 ml		10 hr and 10min	

患者背景

Number of patients	84
Male / Female	65 / 19
Median Age (Range)	60 (33-75)
Performance status	
0 / 1 / 2 / 3 / 4 / unknown	41 / 38 / 0 / 1 / 0 / 4
Histology	
Small cell lung cancer	19
Adenocarcinoma	35
Large cell carcinoma	2
Squamous cell carcinoma	11
Malignant pleural mesothelioma	6
Others	11

シスプラチンに併用した抗癌剤

薬剤	症例数 (%)
Vinorelbine	26 (31)
Etoposide	14 (17)
Docetaxel	12 (14)
Pemetrexed	11 (13)
Gemcitabine	4 (5)
S-1	4 (5)
Irinotecan	3 (4)
others	10 (12)

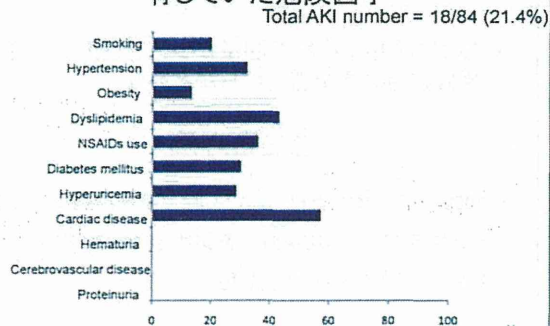
シスプラチン投与前腎機能

Number of patients	84
Serum creatinine	
Median (range)	0.71 (0.5 - 0.99)
eGFR (ml/min/1.73m ²)	
Median (range)	80.9 (59.2 - 113)
> 90	23 (27.4%)
60 - 89	59 (70.2%)
40 - 59	2 (2.4%)

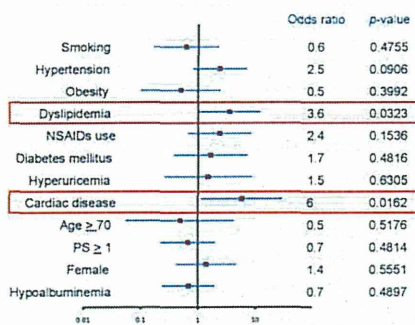
解析に用いた危険因子

リスクファクター	症例数 (%)
Smoking	70 (83.3)
Hypertension	28 (33.3)
Obesity	15 (17.9)
Dyslipidemia	14 (16.7)
NSAIDs use	14 (16.7)
Diabetes mellitus	10 (11.9)
Hyperuricemia	7 (8.3)
Cardiac disease	7 (8.3)
Hematuria	5 (6)
Cerebrovascular disease	4 (4.8)
Proteinuria	2 (2.4)

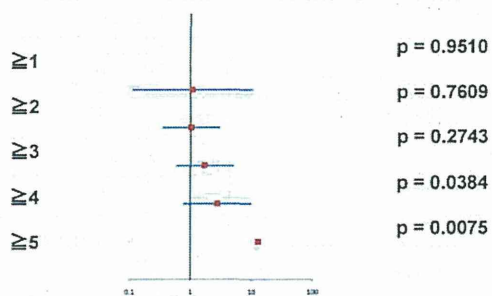
シスプラチン投与後AKIを来した症例が有していた危険因子



単変量解析



Number of CKD risk factors



多変量解析

	Odds ratio	95% C.I.	P-value
脂質異常症・高血圧・糖尿病	5.937	1.0199-37.0239	0.0475

結論 1

- 標準的な腎障害予防策を講じても84例中18例(21.4%)でAKIの定義に抵触していた。
- 脂質異常症、心疾患の有無は、シスプラチンによるAKI発症予測因子となりうる。
- CKD危険因子の数とAKIの頻度は相関していた。
- 脂質異常症、高血圧、糖尿病3つを有する患者はシスプラチンによるAKI発症のリスクが高かった。
- シスプラチン投与前eGFR値とシスプラチンによるAKI発症には有意な相関が認められなかった。

シスプラチン腎症発症のメカニズムとCKD患者における発症予防法の開発

19

背景 2

- 尿細管細胞へのシスプラチン取り込みには、OCT2及びCtr1の関与が示されている
- 近年シラスタチンがシスプラチン腎症、シスプラチン内耳障害予防効果を有することが報告されているが、メカニズムは明らかとされていない

20

ORIGINAL ARTICLE

http://www.tandfonline.com
© 2012 International Society of Nephrology

Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats

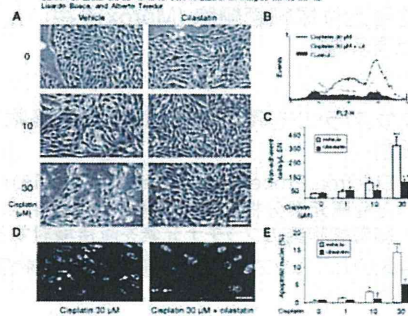
Bianca Humares^{1,2}, Alberto Lazaro^{1,2}, Sonia Camarero¹, Estefanía Moreno-González¹, Jose A. Lazaro¹, Montserrat Blanco-Codesido¹, Jose M. Lara¹, Alberto Ortiz¹, Maria M. Gomez-Gomez¹, Fabio Martin-Vasallo¹ and Alberto Tejedor¹

Table 2 | Effects of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

Group	S _{crea} (mg/dl)	BUN (mg/dl)	GFR (ml/min/100g)	U _{crea} (mg/24h)	U _{urea} (mg/24h)	FE _{crea} (%)	FE _{urea} (%)
Control	0.31 ± 0.02	33.90 ± 1.03	0.83 ± 0.04	15.17 ± 1.38	26.19 ± 3.76	0.47 ± 0.04	0.46 ± 0.03
Cisplatin	0.53 ± 0.02	60.20 ± 2.48	0.72 ± 0.04	18.17 ± 2.18	27.72 ± 2.68	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.05
Cisplatin + Cil	1.10 ± 0.06*	80.00 ± 5.20*	0.28 ± 0.02*	29.14 ± 2.64*	44.36 ± 5.82*	1.85 ± 0.17*	4.64 ± 0.31*
Cisplatin + Cil + Cil	0.87 ± 0.06**	50.00 ± 4.12**	0.58 ± 0.04**	17.30 ± 1.70*	29.00 ± 1.57*	0.78 ± 0.06**	1.81 ± 0.41**

Cilastatin Attenuates Cisplatin-induced Proximal Tubular Cell Damage

Bianca Camarero, Alberto Lazaro, Estefanía Moreno-González, Ana M. Torres, Carmen de Lencastre, Blanca Humares, Jose A. Lazaro, M. Montserrat Blanco-Codesido, Montserrat Blanco-Codesido, Jose M. Lara, Alberto Ortiz, Maria M. Gomez-Gomez, Fabio Martin-Vasallo, and Alberto Tejedor



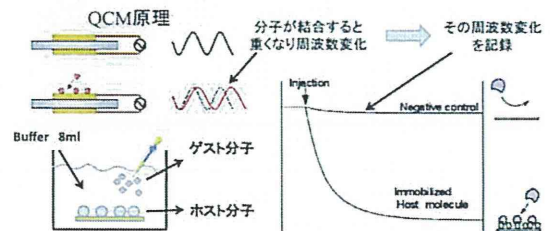
作業仮説

- シスプラチンの尿細管細胞への取り込みにメガリンがトランスポーターとしての役割を果たしている
- シラスタチンのシスプラチン腎症予防効果はメガリンを介したシスプラチン取り込み阻害によっている

23

QCMを用いた分子間結合の確認

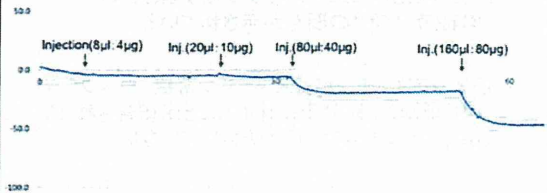
- メガリンリガンドであるかの確認
水晶振動子マイクロバランス法(QCM)を用いて AffinixQIにより結合の有無を確認



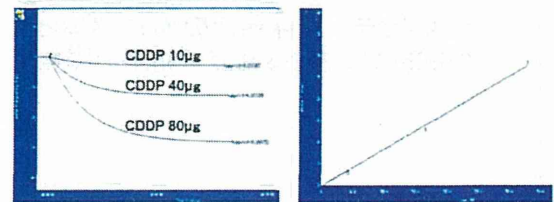
メガリンとシスプラチン

Buffer: 10mM HEPES, pH7.4; 150mM NaCl, and 2mM CaCl₂ · 2H₂O, Ca(+)

メガリン + シスプラチン (0.5mg/ml)



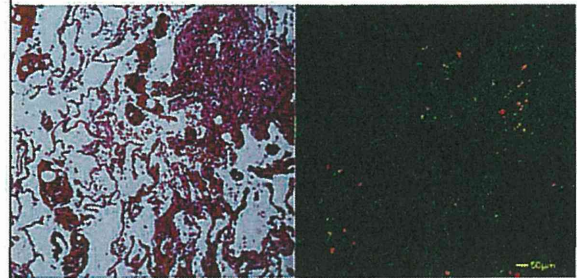
メガリンはシスプラチン結合能を有している



今後の検討課題

- 培養近位尿管細胞 (Mprox)を用いた細胞障害実験
- マウス/ラットを用いた腎障害実験・薬物動態検討
 - Electron Probe Micro Analyzer (EPMA)を用いた金属元素分析と病理組織マッピングにより、尿管細胞内のプラチナ元素を直接検討する
 - メガリンノックアウトマウスを使用した動物実験

波長分散型電子線マイクロアナライザーを用いた肺の元素分析(超合金肺症例)



Hematoxyline-Eosin染色: x10
病理組織診断: 巨細胞性間質性肺炎

緑色: N(窒素)
黄色~赤色: W(タングステン)
使用機種: EPMA-1610(島津製作所製)

