

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業））

分担研究報告書

慢性腎臓病の進行を促進する薬剤等による腎障害の早期診断法と治療法の開発に関する研究

薬剤（抗癌薬、抗菌薬）による腎尿細管障害研究報告

研究分担者

斎藤亮彦	新潟大学	機能分子医学寄附講座	教授
各務 博	新潟大学	呼吸器内科学	講師
田邊嘉也	新潟大学	感染管理部	准教授

研究要旨

メガリンは、近位尿細管細胞の管腔側膜に存在し多くの糸球体濾過物質の再吸収に関わるエンドサイトーシス受容体である。シスプラチン (CDDP)、バンコマイシン (VCM)、コリスチンは、それぞれ腫瘍疾患、MRSA 感染症、多剤耐性緑膿菌感染症における key drug であり、共通する用量規定毒性は近位尿細管障害に基づく腎障害である。これらの薬剤と同様な腎障害を来すアミノグリコシド系抗菌薬は、メガリンを介して再吸収され腎障害を惹起することが証明されている。一方、CDDP、VCM、コリスチンの腎障害にメガリンが果たす役割は明らかとされていない。

本研究は、薬剤性腎症の中で特に近位尿細管細胞障害を来すメカニズムにメガリンが果たす役割を、基礎的検討、臨床的検討において明らかとし、薬剤性腎障害の早期診断マーカー、予防法、予防薬を明らかにすることをその目的として行った。

基礎的検討として、水晶振動子マイクロバランス法により、CDDP、VCM、コリスチンがメガリンリガンドであることが明らかとした。ApoE-Cre システムにより近位尿細管細胞にモザイク状にメガリン発現がノックアウトされたマウスにコリスチンを投与したところ、尿細管細胞障害はメガリンを発現する細胞にのみに認められた。臨床的検討として CDDP 投与患者尿検体を経時的に解析したところ、CDDP 投与後約 10 日目に生じる血清クレアチニン上昇は、投与後 24-48 時間に見られる一過性尿中メガリン増加に相関していた。これに対して、N-gal、NAG、 β 2-microglobulin では血清クレアチニン上昇を予測することはできなかった。これらの結果は、尿細管細胞への腎障害性薬剤取り込みにメガリンが大きな役割を果たしていることを強く示唆している。

今後、臨床的検討により尿中メガリンが薬剤性腎障害の早期診断マーカーとして有用であることをさらに証拠づける取り組みを進める。これとともに、メガリンに対して競合的結合阻害効果を有する化合物を用いて、薬剤性腎障害予防法の解明を進める。これら、薬剤性腎障害早期診断法、予防法は同じメカニズムを有する腎障害性薬剤に広く適応可能な新規治療となることが期待できる。

A. 研究目的

平成 21-23 年度・厚生労働科学研究腎疾患対策事業「CKD の早期発見・予防・治療標準化・進展阻止に関する調査研究」(今井圓裕代表)において、CKD 増悪因子として薬剤性腎障害が注目された。この中で、原因薬剤の 25.1%が NSAIDs、18.0%が抗腫瘍薬、17.5%が抗菌薬と報告されている。抗腫瘍薬、抗菌薬による腎障害に有効な改善策を持たない現状は、CKD 患者に対して十分な薬物治療がなされないという不利益を生んでいる。

本研究では、腎障害性が用量規定毒性である抗腫瘍薬としてシスプラチン(CDDP)を、腎障害性抗菌薬としてバンコマイシン(VCM)、コリスチンを対象として、尿細管細胞障害のメカニズムを解明し、早期発見マーカー、腎障害予防策を明らかとすることを目的としている。

[背景]CDDP は、肺癌、胃癌、頭頸部癌、胚細胞腫瘍などにおいて今なお key drug である。VCM は MRSA 治療薬の中心的薬剤であり、コリスチンは多剤耐性緑膿菌に対する切り札と考えられている。

これらの薬剤に共通する性質として、

カチオン性水溶性薬剤である、糸球体から濾過され近位尿細管細胞に高度に蓄積して腎障害を来す、尿細管細胞障害とともに内耳障害を来す、などがある。同様な性質を持つアミノグリコシド系抗菌薬では、エンドサイトーシス受容体としてのメガリンが尿細管細胞障害、内耳細胞障害に関与していることが証明されている。一方、CDDP、VCM、コリスチンの腎障害にメガリンが果たす役割は明らかではない。

B. 研究方法

I. 水晶振動子マイクロバランス法(QCM)による分子間結合性の検討

メガリン分子を結合させたセンサーを用いて、薬剤とメガリンとの結合性の有無を水晶振動子の周波数変化により検出した。

II. メガリンノックアウトマウスを用いた尿細管細胞障害の検討

ApoE-Cre システムにより近位尿細管細胞のメガリン発現をモザイク状にノックアウトしたマウスを用い、薬剤性尿細管障害がメガリン発現と相関するかについて組織学的解析を行った。

III. 波長分散型電子線マイクロアナライザー(EPMA)を用いた尿細管細胞内CDDP分子取り込みの検討

CDDP がプラチナ原子を持つことを利用し、プラチナ原子の有無をEPMAで解析後、組織マッピングした。この方法により、尿細管細胞内へのCDDP取り込みを可視化し、CDDPの尿細管細胞取り込みを半定量する。

IV. CDDP投与患者における尿中メガリン及び腎障害マーカー動態の検討

実地臨床としてCDDP投与を行っている肺癌患者に同意取得の上、観察研究として経時的に尿採取を行い、尿中のメガリン全長(C-megalin)、メガリン細胞外ドメイン(A-megalin)、N-gal、NAG、 β 2-microglobulin等の解析を行う。

V. CDDP投与患者の腎障害に影響するCKDリスク因子の疫学的検討

CDDPにより治療を受けた肺癌患者を対象として、後方視的に臨床検査データを解析した。臨床データ解析に

については、全患者より包括同意を取得済みである。

(倫理面への配慮)

CDDP 投与患者における尿中メガリン及び腎障害マーカーの動態検討については、新潟大学医学部倫理委員会より承認を受けている。尿採取に先立って、説明と書面による同意を取得した。

C. 研究結果

I. 薬剤のメガリン結合能

メガリン分子結合センサーを用いて行った実験の結果、コリスチン添加による QCM 周波数低下が認められ、メガリンはコリスチン結合能を有していた (Fig. 1)。

CDDP 投与においても、用量依存性に QCM 周波数低下が認められ、メガリンは CDDP 結合能を有することも明らかとなった (Fig. 2)。

さらに、それらの薬剤がメガリンに結合することに拮抗する化合物の検討を行った。

II. メガリン依存性コリスチン尿細管細胞障害

ApoE-Cre システムにより近位尿細管細胞にモザイク状にメガリン発現がロックアウトされたマウスに、腎障害性抗菌薬であるコリスチンを投与し、組織学的検討を行った。Fig. 3 に示すように、メガリン発現を残す尿細管細胞のみに空胞変性を認め、メガリン発現のない尿細管細胞にはこの変化を認めなかった。したがって、コリスチンによる尿細管細胞障害はメガリン依存性であることを明らかにした。

III. EPMA による CDDP の尿細管細胞取り込みの可視化

尿細管細胞への CDDP 取り込みを可視化し、半定量を可能とすることは、CDDP 腎症に至るメカニズム解明の端緒となる。CDDP7.5mg/kg 投与 4 時間後の尿細管細胞において赤色のドットで示すプラチナ原子を検出することができることが世界で初めて確認された (Fig. 4)。

IV. CDDP 投与患者における尿中腎障害マーカーとメガリン

CDDP 投与を受けた 4 名の肺癌患者の eGFR 変化を Fig. 5 に示している。Case A, C では 30 ml/min を超える eGFR 低下を認められ、Case B, D ではわずかな eGFR 変化にとどまっていた。CDDP 投与後経時的尿検体中の A-megalin/ u-Cre は、eGFR 低下が大きく認められた Case A, C において投与後 24-48 時間後に 200 μ g/g Cre を超えていた (Fig. 6)。これに対して、eGFR の変化が少なかった Case B, D では A-megalin/ u-Cre の上昇は軽度にとどまった。acute kidney injury (AKI) マーカーの一つである尿中 N-gal の増加は、CDDP 投与による eGFR 変化と相関しなかった (Fig. 7)。尿細管細胞障害マーカーとしての NAG、 β 2-microglobulin も eGFR 変化と良い相関を示さなかった (Fig. 8)。

V. CDDP 腎症に影響する CKD リスク因子

CDDP 投与を受けた肺癌患者 84 症例 (Table 1) について後方視的に臨床検査データを単変量解析した結果、RIFLE criteria に合致する AKI を生じる危険因子として、脂質異常症 (Odds ratio 3.6, $p = 0.0323$) と心疾患 (Odds ratio, $p = 0.0162$) が検出された。

D. 考察

腎障害を来す抗菌薬としてコリスチン、抗腫瘍薬としてCDDPを用いた。薬剤性腎障害発生における尿細管細胞エンドサイトーシス受容体であるメガリンの役割を明らかにすることを目的として基礎的検討の結果、コリスチン、CDDPともにメガリンと結合することが明らかとなった。さらに、メガリンノックアウトマウスにコリスチンを投与して生じた尿細管細胞障害は、メガリン発現を残している尿細管細胞に限られており、コリスチン腎障害がメガリン依存性であることが示唆された。これは、管腔側からメガリンを介して再吸収される薬剤が尿細管細胞障害にきわめて重要であることを示している。これは、薬剤性尿細管細胞障害を予防するために、メガリンが標的分子となりうると考えられた。

CDDPの尿細管細胞への取り込みをEPMAにより可視化することに成功しており、今後、CDDPの尿細管細胞再吸収、尿細管細胞障害におけるメガリンの役割を明らかにする。

CDDP投与10日後に生じる血清Cre上昇、eGFR低下は、尿中NAG、 β 2-microglobulin、N-galとは相関を示さなかった。これに対して、CDDP投与24-48時間後の尿中A-megalin/u-Cre上昇のみがこのeGFR低下と関連していることが示され、CDDPによる尿細管細胞障害にメガリンが関与することを強く示唆していた。

E. 結論

腎障害を主な副作用としている抗菌薬、抗腫瘍薬に共通する尿細管細胞取り込み、障害メカニズムにメガリンが大きく関与していることが、基礎的検討、臨床的検討から示唆された。今後、薬剤性腎障害早期

診断マーカーとしてのメガリンの有用性を証拠付ける臨床研究のさらなる推進とともに、メガリンを標的とした薬剤性腎障害予防法、予防薬の解明を進めていく。メガリンを標的とした薬剤性腎障害早期診断、予防法は、同じメカニズムを有する腎障害性薬剤に広く適応可能な新規治療となることが期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1.論文発表
- 2.学会発表

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許出願
斎藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織：「メガリンリガンド拮抗薬」特願2014-011530(平成26年1月24日)
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし