

20150201  
平成26年度成田班  
慢性腎臓病の進行を促進する薬剤等による腎臓病の早期診断法と治療法の開発  
会議資料

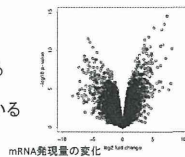
## 新しい薬剤性腎障害マーカーの探索 vanin-1について

日本医大腎臓内科  
鶴岡秀一

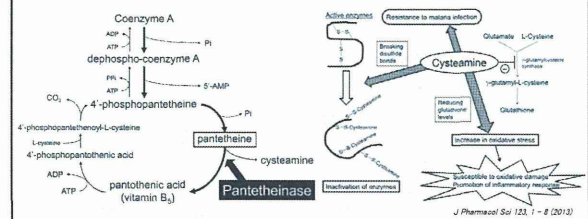
- 腎障害の治療には、早期診断・早期治療が肝要
  - 糸球体機能の指標である血清クレアチニン濃度は変化に時間がかかることが大きな問題である
- ⇒(急性)腎障害早期指標の開発が進んでいる
- NGAL, kim-1, L-FABP, megalin, etc.が臨床応用されつつある
- しかし、“薬剤性”腎障害に限定した指標はない

- 我々は健康人腎組織から採取した近位尿管初代培養細胞(およびリンパ球)を用いて、in vitroにおいて各種毒性有機溶媒・薬剤を添加した時に発現の変化するmRNAを網羅的に解析した

全ての添加物において、同様に発現変化をするmRNAを同定した  
この中で既に生理的意義のある程度判明しているものとしてVNN-1(vanin-1)に着目した

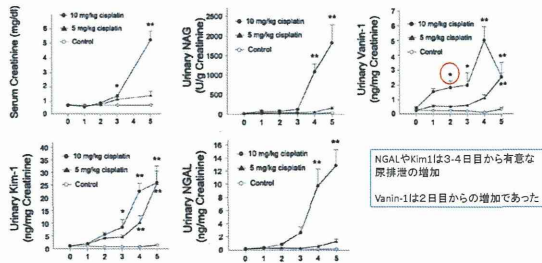


- 【vanin-1】
- 上皮細胞膜表面上に発現しているpanthetheinaseの一つ
  - パントチンをパントチン酸へ分解する際の酵素として働く
  - その分解する際に生じるシステアミン
    - グルタチオンの産生を抑制
    - 酵素のジスルフィド結合を分解 ⇒酸化ストレスに関与
    - GPI-anchored proteinの一つ



シスプラチン投与時の各種マーカーの変化

Time course of urinary vanin-1 and traditional biomarkers in rats treated with cisplatin.

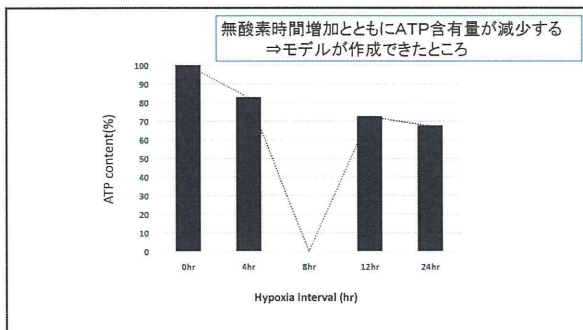
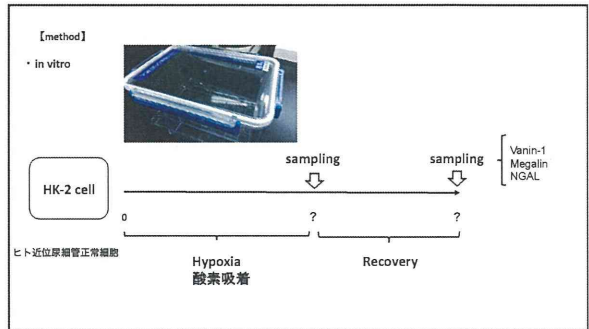
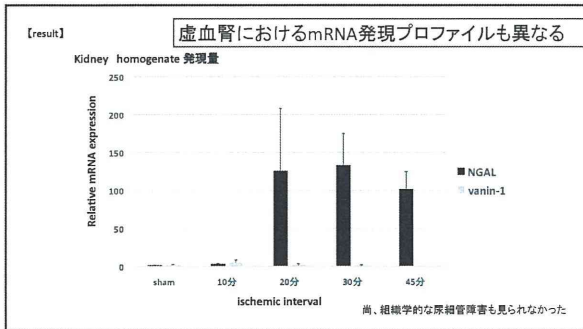
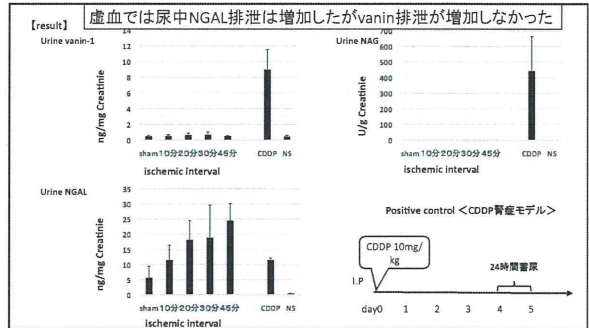
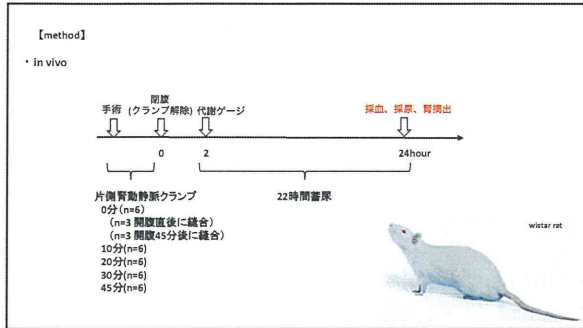


### 今までのまとめ

- 我々は早期薬物性急性腎障害マーカーであるvanin-1を発見した
- vanin-1はパントチナーゼであるが、シスプラチンやゲンタマイシンによる急性腎障害においてほかのどのバイオマーカーよりも早期に上昇することを今まで示してきた

### 今年度の目標

- 薬剤による腎障害と比較検討するために、vanin-1が虚血時の腎障害マーカーにもなるか否かについて、in vivoおよびin vitro腎虚血再灌流モデルを用いて検討した



- まとめ**
- Vanin-1もシスプラチンやゲンタマイシンによる急性腎障害においては、既知の腎障害バイオマーカーと同等(もしくはより早期に)尿中排泄が上昇する
  - 虚血再灌流時にはvanin-1とNGALの動態に乖離がある  
 \* 尚組織学的(PAS染色)に明らかな尿細管障害は認めなかった  
 ⇒双方を測定含むパネルを作成し、AKI時に同時に評価することで、その原因を考察できる可能性がある
  - In vitroにおける低酸素による尿細管細胞障害モデルを確立しつつある

### 次年度の予定

- In vivo 虚血モデル：形態学的評価を加える
  - 尿細管傷害度の評価(TUNEL染色、caspase-3染色)、
  - Vanin-1染色
- In vitro 虚血モデル：In vivoと同じような傾向がみられるのか検討
  - NGAL, vanin-1の培地中測定
  - 細胞内での発現量評価

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）  
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

研究課題：入院患者データベースを用いた急性腎障害発症頻度・要因の解析

研究分担者 寺田典生

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究要旨：高知大学医学部附属病院における30年間の入院患者データ約8万人の解析をKDIGO-AKIの診断基準に基づいて行った。AKIの発症頻度は13.11%であり、従来の報告より発症頻度は高かった。また尿酸値とAKIの頻度は尿酸4台を最下点にJカーブをたどっていた。また60歳以上ではAKI発症頻度は14%以上を占めたことにより、高齢者の多い高知県での特性が現れた可能性がある、今後本邦全体で高齢化が進む事を考慮すると急性腎障害は極めて重要な研究課題となりうる。

現時点で薬剤性腎障害に有効な薬剤はないが、今回シスプラチン(CDDP)投与(8mg/kg)により、ラット急性腎障害モデルを作成し、ALA(5-Aminolevulinic acid)を飲水により投与し、腎保護作用を検討した。CDDP投与によるミトコンドリア障害から誘導されるアポトーシスは、ALA投与による抑制し腎保護作用を認める事ができた。ALAはすでに医薬品として安全性も確認されており、今後臨床応用が期待される

#### A. 研究目的

急増する慢性腎臓病(CKD)患者に対して、安全で有効な治療を提供できないことが多い。近年急性腎障害(AKI)は高齢化によりその頻度が急増しているのみならず、30%程度がCKDに移行する事が知られており、急性腎臓病の対策は急務である。また少なくとも全入院患者の1%前後が薬剤性腎障害であり、その半数以上が直接型腎障害、35%程度は不可逆性腎障害であると想定されている。また潜在的な薬剤性腎障害による既存のCKDの進行と急性腎不全の発生も多いが、正確な実態、対策のターゲットは不明である。

本研究では、高知大学の医療情報部の強力を得て、電子カルテ上で30年間の入院患者78626名の急性腎障害(AKI)の発症頻度とリスクファクターを解析し、正確な発症頻度を明らかにする。代表的な薬剤性腎障害モデルであるシスプラチン腎症ラットを用いて新規の薬剤であるALA(5-Aminolevulinic acid)の腎保護作用の基礎研究を併行して行い、薬剤性腎障害の病態機序の解明を行う。

#### B. 研究方法

1) 急性腎障害の発症頻度の検討：高知大学の医療情報部の強力を得て、電子カルテ上で30年間の18歳以上の入院患者78626名のデータベース解析を行った。急性腎障害の診断は48時間以内の採血で、血清Crが1.5倍以上あるいは0.3mg/dl以上上昇した患者とし、電子カルテ上での各種マーカーとの関連の解析、発症頻度の解析を行った。

2) ラットにおけるALA投与でCDDP腎症の検討：シスプラチン(CDDP)投与(8mg/kg)により、ラット急性腎障害モデルを作成し、ALA(5-Aminolevulinic acid)を飲水により投与し、腎保護作用を検討した。培養尿細管細胞を用いてALAのミトコンドリアへの保護作用を検討した。

(倫理面への配慮)

上記研究計画については高知大学医学部動物実験審査委員会で承認されている(承認番号G-00098)。電子カルテのデータベース解析については匿名化を行い個人情報は厳重に管理されている。高知大学倫理委員会に申請中である。

#### C. 研究結果

#### 1) 急性腎障害の発症頻度の検討

AKI の臨床的検討：高知大学医学部附属病院における 30 年間（1981～2010 年）の入院患者データ約 8 万人のうち、KDIGO-AKI の診断基準に基づいて解析をおこなったところ、AKI の発症頻度は 13.11% であり、ピークは 70 歳台、60 歳以上では 14% 以上を占めた。尿酸値と AKI の頻度は尿酸 4 台を最下点に J カープをたどっていた。オッズ比は尿酸が 7 以上では 2.9 倍、10 以上では 14 倍となりまた 2 以下の場合も 3.4 倍になった。

#### 2) ラットにおける ALA 投与で CDDP 腎症の検討

シスプラチン (CDDP) 投与 (8mg/kg) により、ラット急性腎障害モデルを作成し、ALA (5-Aminolevulinic acid) を飲水により投与し、腎保護作用を検討した。低酸素化でミトコンドリア障害が起こるとアポトーシスが起るが、ALA がそれを抑制した。CDDP 投与 (8mg/kg) によるミトコンドリア障害によるアポトーシスは、ALA 投与による抑制された。ラットにおいて、ALA 投与で CDDP 腎症における BUN, Cr の上昇が抑制された。CDDP による腎障害は、ALA によるミトコンドリアの回復で改善することがわかった。また ALA と鉄剤の併用により、ミトコンドリアの保護と抗アポトーシス作用が増強し、尿細管障害が抑制された。培養細胞において、ALA に加えて鉄の投与下で尿細管保護作用、ミトコンドリアへの保護作用が認められた。

#### D. 考察

高知大学医学部附属病院における 30 年間の入院患者データ約 8 万人のうち、AKI の発症頻度は 13.11% であり、従来の報告より発症頻度は高かった。要因として 70 歳台、60 歳以上では 14% 以上を占めたことにより、高齢者の多い高知県での特性が現れた可能性がある、今後本邦全体で高齢化が進む事を考慮すると急性腎障害は極めて重要な研究課題となりうる。また尿酸値が AKI の発症リスクになる事が判明し、今後その機序の解明が待たれる。

現時点で薬剤性腎障害に有効な薬剤はないが、今回、ALA は急性腎障害への臨床応用の可能性の高い薬剤と考えられる。ALA はすでに医薬品として安全性も確認されており、臨床応用が期待される。

#### E. 結論

高知大学の入院患者約 8 万人のデータより、AKI の発症頻度は入院患者の 13% であり、従来の報告より発症頻度は高く尿酸値が AKI の発症リスクになる事が判明した。シスプラチン腎症ラットモデルにおいて ALA の腎保護作用を認める事ができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Taniguchi Y, Shimamura Y, Horino T, Fujimoto S, Terada Y : Serum levels of soluble urokinase plasminogen activator receptor in Japanese patients with chronic kidney disease. *Kidney International* 86:209-210, 2014.

Takao T, Horino T, Matsumoto R, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Terada Y : Possible roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II type 1 receptor on high glucose-induced damage in renal proximal tubular cells. *Ren Fail.* 37(1):160-164, 2014.

Fukuhara H, Taniguchi Y, Matsumoto M, Kuroda N, Fukata S, Inoue K, Fujimoto S, Terada Y, Shuin T : IgG4- related tubulointerstitial nephritis accompanied with cystic formation. *BMC Urol*, 2014

Taniguchi Y, Matsumoto T, Tsugita M, Fujimoto S, Terada Y. : Spondylodiscitis and Achilles tendonitis due to gout. *Mod Rheumatol* 24(6): 1026-1027, 2014.

Taniguchi Y, Karashima T, Yoshinaga Y, Shuin T, Fujimoto S, Terada Y. : Clinical characteristics of Japanese patients with reactive arthritis following intravesical BCG therapy for bladder cancer. *Mod Rheumatol* 25(1): 161-163, 2014

Taguchi T, Nakajima H, Terada Y. : Graves' dermopathy and acropachy. *Endocrine*, 2014

Taguchi T, Takao T, Terada Y. : Natural progression of a sporadic pheochromocytoma over 15 years. *Endocrine* 2014

Taguchi T, Terada Y.: Images in clinical medicine. Subperiosteal bone resorption. *N Engl J Med* 370(21) : e32, 2014.

Taguchi T, Nakayama S, Fujimoto S, Terada Y. : Lupus nephritis with positive myeloperoxidase / proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic autoantibody that developed after 17 years of propylthiouracil therapy. *Endocrine* 46(2): 357-359, 2014.

Taguchi T, Inoue K, Terada Y. : Concentric-ring sign in adrenal hemorrhage. *Endocrine* 47(3) : 965-966, 2014.

Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kamijima R, Fujimoto C, Kataoka S, Terada Y, Sano S.: Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 66(3):694-706, 2014.

堀野太郎, 寺田典生:急性腎障害 (AKI) の診断と治療, *週刊医学のあゆみ* 249 (9) :737-742, 2014.

大出(濱田)佳寿, 谷口義典, 島村芳子, 松本竜季, 緒方巧二, 井上紘輔, 堀野太郎, 寺田典生:高血圧と(プロ)レニン受容体循環器内科 76(4):410-413, 2014.

## 2. 学会発表

Matsumoto T, Taniguchi Y, Hamada K, Shimamura Y, Inoue K, Ogata K, Horino T, Yuasa K, Fujimoto S, Terada Y. : Inflammatory Marker MRP8/14 is correlated with Body Mass Index and Modulates Disease Progression in Japanese Patients with CKD, The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Hamada K, Taniguchi Y, Shimamura Y, Matsumoto T, Ogata K, Inoue K, Horino T, Terada Y : The Different Kinetics of Dickkopf-1 and Sclerostin in Japanese Patients with Chronic Kidney Disease, The

47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Shimamura Y, Matsumoto T, Hamada K, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Yuasa K, Sugiura T, Terada Y : NTpro-BNP and Troponin T Is a Novel Valuable Biomarker for Progression of CKD Patients: A Longitudinal Follow-Up Study, The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Fujimoto S, Terada Y : Small Heat Shock Protein beta-1 (HSPB1) Is Up-Regulated and Regulates the Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury In Vitro and In Vivo. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Shimamura Y, Sano T, Noguchi Y, Taniguchi Y, Matsumoto T, Hamada K, Inoue K, Horino T, Fujimoto S, Terada Y, Ogata K : Arginase2 Is Up-Regulated in Renal Tubules of AKI, and Inhibition of Arginase2 Ameliorates the Prognosis of AKI by Regulated NO In Vivo, The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Terada Y, Ide H, Matsumoto T, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Fujimoto S: Thioredoxin- Interacting Protein (TXNIP) Is Up-Regulated and Regulates the Mitochondrial Function, NOX4, and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury In Vitro and In Vivo, The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Hamada K, Matsumoto T, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Terada Y : MicroRNA-34a Is Up-Regulated in Acute Kidney Injury and by Aging and

Regulates Pnuts (PPP1R10) Expression and Apoptosis of Renal Tubular Cells In Vitro and In Vivo. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

Horino T, Otomo K, Miki T, Kataoka H, Hatakeyama Y, Matsumoto T, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Terada Y, Okuhara Y : High and Low Level of Serum Uric Acid Is a Novel Risk Factors for Acute Kidney Injury: A Retrospective Database Analysis by Using the Integrated Medical Information System at Kochi Medical School Hospital. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, Nov 13-16, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

# 急性腎障害のリスクファクター： 尿酸と加齢関連遺伝子

高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科

寺田典生

## 平成26年度報告

- 電子カルテ上の78626人のデータ解析
  - AKIのリスク因子としての尿酸
  - CKD患者のAKI発症頻度と予後の解析
- 加齢とAKIの関連
  - 加齢により低下するPhosphatase(PNUTS)のAKIでの意義の検討

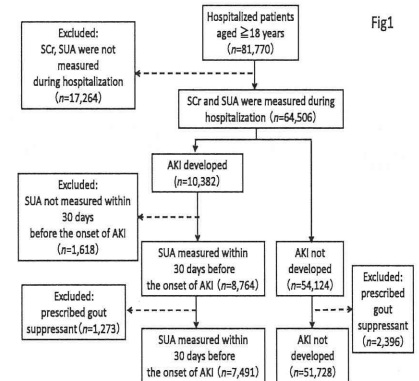
## 高知大学医学部附属病院の30年間のAKIの頻度

高知大学医療情報部との共同研究

・高知大学医学部附属病院の病院情報システム上のIMIS (Integrated Medical Information System) 解析用データウェアハウス RYOMA2 (Retrieval sYstem for Open Medical Analysis) に蓄積された1981-2010年の入院患者データ

・18歳以上の入院患者数：68504名  
(男性：33200名, 女性：35304名)

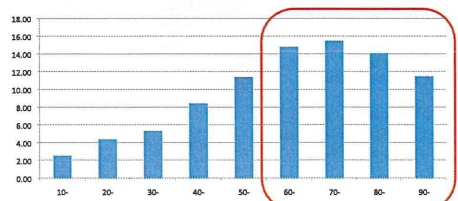
## Flow chart of the study cohort.



Study Cohort	eGFR<sub>90</sub>(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )													
	<2.0mg/dl	2.0mg/dl <SUA<	2.5mg/dl <SUA<	3.0mg/dl <SUA<	3.5mg/dl <SUA<	4.0mg/dl <SUA<	4.5mg/dl <SUA<	5.0mg/dl <SUA<	5.5mg/dl <SUA<	6.0mg/dl <SUA<	6.5mg/dl <SUA<	7.0mg/dl <SUA<	7.5mg/dl <SUA<	8.0mg/dl <SUA<
Study Cohort	59219	1598	2097	3788	5793	8922	7682	7118	6517	5374	4108	2940	5308	3308
Female	30540	1064	1533	2798	4215	6778	4680	3605	2789	1932	1160	897	1409	1409
Male	28679	532	564	892	1578	2144	3002	3481	3748	3441	2448	2043	3899	1899
Basic characteristics														
Age(yr)<sub>SD</sub>	68.8±17.9	68.1±18.4	66.4±18.5	65.8±18.8	65.8±18.5	64.8±18.2	64.1±18	63.7±17.3	63.9±17.2	63.2±17.7	62.5±17.4	61.1±17.1	61.1±17.1	61.1±17.1
SUA (mg/dl)<sub>±SD</sub>	4.8±1.7	1.8±0.4	2.3±0.1	2.8±0.1	3.3±0.1	3.8±0.1	4.3±0.1	4.8±0.1	5.3±0.1	5.8±0.1	6.3±0.1	6.8±0.1	7.3±0.1	7.8±0.1
eGFR<sub>90</sub>(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )<sub>SD</sub>	82±25	102±50	92±44	82±40	82±38	82±31	82±24	81±28	78±28	75±28	72±28	70±27	68±24	66±24
Kidney function: eGFR<sub>90</sub>(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	21.8	11.2	8.5	8.9	10.8	13.8	15.4	18	22.3	26.5	31.4	35.4	41	54
Comorbidity														
Diabetes(%)	15.8	17.1	13.9	13.3	13.8	13.9	13.9	13.3	13.7	13.2	12.8	12.2	11.7	11.1
Hypertension(%)	29	15.4	15.8	14.9	13.5	13.2	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3
Ischemic Heart	11.7	7.9	7.1	7.1	8.3	8.8	9	11.8	12.4	12.8	13.2	13.7	14.3	14.9
Heart Failure(%)	7.2	5.3	4.1	4.3	4.3	4.9	5	6.2	7	8	9.8	10.8	11.4	11.9
Other Heart Disease(%)	10.8	7.4	8.8	7.3	7.8	8.5	8.1	10.8	11.3	12.8	12.4	13.6	13.7	14.3
Cerebrovascular disease	12.2	13.4	12.9	10.4	10.3	10	11.1	12.4	11.8	13.4	13.1	13.1	13.7	14.3
Disease of artery, aortic or coronary vessels, (%)	8.5	4.3	3.7	3.5	4.3	4.3	4.7	6.1	6.8	8.1	8.9	9.3	9.8	10.3
Cancer(%)	29.9	41.1	38.1	33	30.4	29.7	29.1	29.3	28.8	28.2	27.4	26	25.3	24.6
Liver disease(%)	10.8	11.2	8.3	8.5	8.7	8.7	8.3	10.8	10.3	11.4	11.8	12.8	13.8	14.8
Medication usage														
Diuretic(%)	30.9	34.3	22.2	19	17	16.5	16.7	18	18.1	20	21.8	25	27.7	30.7
ACE inhibitor(%)	4.9	3.3	2.7	2.6	3.1	3.3	3.5	4.2	4.9	5.5	6.1	7.2	8	9
ARB(%)	4.2	2.8	2.7	2.8	3	2.9	3.1	4	4.4	5.2	6.3	7.5	8.5	9.5
Antiplatelet(%)	72.6	87.4	80.4	77.3	76.7	73.7	72.3	70.6	71.5	69.7	70.1	68.1	67.4	67.4
NSAID(%)	28.4	47.7	48.7	42.8	42.8	41.9	40.8	39.5	38.3	37	36.8	35.1	34.5	34.5
Anticoagulant usage(%)	12.4	18.8	18.5	18.3	18.2	18	17.7	17.3	17	16.8	16.8	16.1	15.5	14.8
Contrast media(%)	41.1	51.5	44.8	42.9	40.8	41.4	40.3	40.9	40.9	41	40.1	40	38.4	38.4
Procedures														
Cardiac surgery(%)	1.2	0.4	0.5	0.7	0.8	0.7	0.8	1.3	1.4	1.1	1.2	1.5	2.8	3.8
Thoracic surgery(%)	1	1.1	1	1	0.7	1.2	1	0.8	1.1	1.2	1.2	1.2	1	1
Vascular surgery(%)	1.1	0.8	0.8	0.6	1	1.1	0.8	1.3	1	1	1.2	1.8	1.5	1.5
AKI outcome														
AKI	7481	482	339	463	582	802	703	680	614	548	506	452	1550	1550
nonAKI	51728	1114	1758	3325	5211	8320	6958	6436	5903	4826	3600	2488	3788	3788

## 年齢ごとのAKI発症率

AKI/non_AKI %	10-	20-	30-	40-	50-	60-	70-	80-	90-
AKI	25	258	386	696	1461	2644	2818	1026	84
non_AKI	976	5848	7205	8236	12806	17854	18185	7284	730
%	2.56	4.41	5.36	8.45	11.41	14.81	15.50	14.09	11.51



\*AKIは60歳以上で14%以上の発症となる



Adjusted odds ratios for AKI incidence plotted against serum UA levels

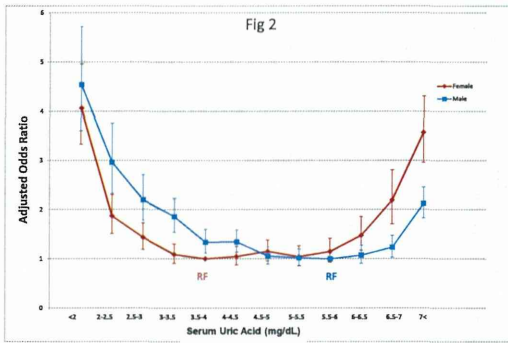


Table 4. Adjusted odds ratios of risk factors associate with AKI development

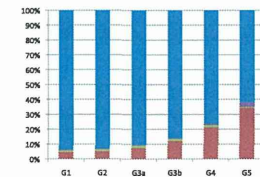
Risk Factors of AKI	Female			Male		
	OR	95%CI	P-Value	OR	95%CI	P-Value
<b>Demographics</b>						
Age(10years)	0.9	0.87-0.92	<0.001	0.9	0.87-0.92	<0.001
<b>Comorbidities</b>						
Diabetes	1.31	1.17-1.47	<0.001	1.15	1.05-1.26	0.004
Hypertension	1.08	0.87-1.21	0.146	1.33	1.21-1.45	<0.001
Ischemic heart disease	1.09	0.93-1.25	0.226	1.04	0.93-1.16	0.532
Heart failure	1.01	1.3-1.76	<0.001	1.28	1.13-1.46	<0.001
Other Heart Disease	1.03	0.9-1.18	0.893	1.11	1-1.25	0.007
Cerebrovascular disease	1.24	1.09-1.42	0.001	1.15	1.04-1.28	0.009
Disease of artery, arteriole or capillary vessels	1.23	1.03-1.47	0.019	1.47	1.27-1.69	<0.001
Cancer	2.13	1.92-2.36	<0.001	2.59	2.36-2.82	<0.001
Liver Disease	1.99	1.39-1.8	<0.001	1.62	1.47-1.79	<0.001
<b>Kidney function</b>						
eGFR<60(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	2.7	2.43-2.99	<0.001	2.81	2.58-3.06	<0.001
<b>Medication</b>						
Diuretics	3.8	3.29-3.95	<0.001	4.14	3.83-4.47	<0.001
ACE inhibitors	0.78	0.62-0.92	0.005	0.73	0.62-0.85	<0.001
ARBs	0.88	0.55-0.93	<0.001	0.74	0.62-0.87	<0.001
Antibiotics	2.41	2.13-2.72	<0.001	2.48	2.23-2.76	<0.001
NSAIDs	0.87	0.89-1.06	0.489	1.02	0.95-1.11	0.555
Anticancer drugs	1.36	1.21-1.54	<0.001	1.01	0.91-1.11	0.815
Contrast media	1.94	1.41-1.69	<0.001	1.28	1.18-1.38	<0.001
<b>Procedures</b>						
Cardiac surgery	3.64	2.78-4.79	<0.001	3.85	3.04-4.88	<0.001
Thoracic surgery	0.79	0.5-1.28	0.322	0.89	0.66-1.19	0.428
Vascular surgery	2.43	1.71-3.46	<0.001	2.29	1.78-2.93	<0.001
<b>SUA level</b>						
SUA ≤ 2(mg/dL)	4.08	3.33-4.96	<0.001	4.54	3.6-5.72	<0.001
2<SUA ≤ 2.5 (mg/dL)	1.87	1.51-2.31	<0.001	2.96	2.24-3.78	<0.001
2.5<SUA ≤ 3 (mg/dL)	1.43	1.19-1.73	<0.001	2.2	1.78-2.71	<0.001
3<SUA ≤ 3.5 (mg/dL)	1.09	0.91-1.3	0.354	1.86	1.55-2.24	<0.001
3.5<SUA ≤ 4 (mg/dL)	1			1.54	1.12-1.81	0.001
4<SUA ≤ 4.5 (mg/dL)	1.05	0.88-1.25	0.812	1.35	1.14-1.59	<0.001
4.5<SUA ≤ 5 (mg/dL)	1.15	0.96-1.38	0.133	1.06	0.9-1.25	0.488
5<SUA ≤ 5.5 (mg/dL)	1.04	0.86-1.27	0.681	1.02	0.87-1.2	0.801
5.5<SUA ≤ 6 (mg/dL)	1.18	0.93-1.42	0.207	1		
6<SUA ≤ 6.5 (mg/dL)	1.48	1.17-1.86	<0.001	1.08	0.91-1.28	0.259
6.5<SUA ≤ 7 (mg/dL)	2.19	1.71-2.81	<0.001	1.24	1.04-1.48	0.019
7<SUA (mg/dL)	3.87	2.98-4.91	<0.001	2.13	1.83-2.46	<0.001

Table 5. Adjusted odds ratios of SUA levels associate with AKI development in sensitive analysis

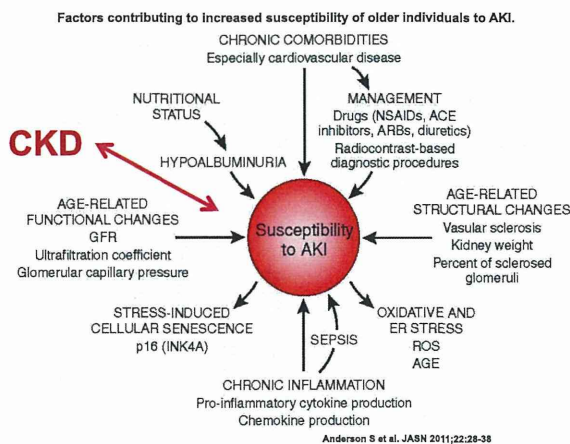
SUA level	Female			Male		
	OR	95%CI	P-Value	OR	95%CI	P-Value
SUA ≤ 2(mg/dL)	2.38	2.80-4.03	<0.001	4.18	3.33-5.24	<0.001
2<SUA ≤ 2.5(mg/dL)	1.45	1.19-1.76	<0.001	2.79	2.21-3.53	<0.001
2.5<SUA ≤ 3(mg/dL)	2.69	2.28-3.21	<0.001	1.45	1.24-1.69	<0.001
3<SUA (mg/dL)	14.7	10.15-21.34	<0.001	8.57	4.95-8.57	<0.001

CKD患者におけるAKIの頻度とステージ

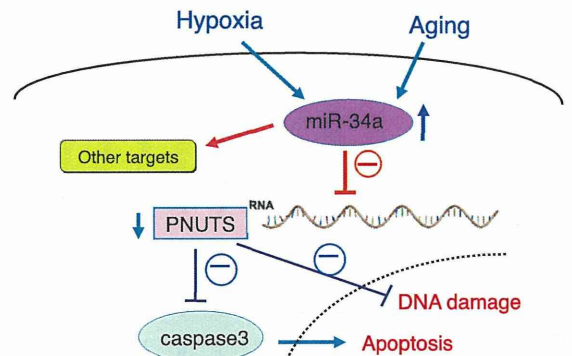
	G1	G2	G3a	G3b	G4	G5
non AKI	39246	54793	13675	3797	1081	472
stage1	2054	3205	1179	547	306	266
stage2	448	656	220	60	19	4
stage3	162	303	101	22	12	25



母比率の多重検定(ボンフェローニの調整)で、全部の組み合わせで有意p<0.05



急性腎障害時の低酸素と加齢によるPNUTSのシグナル(Hypothesis)

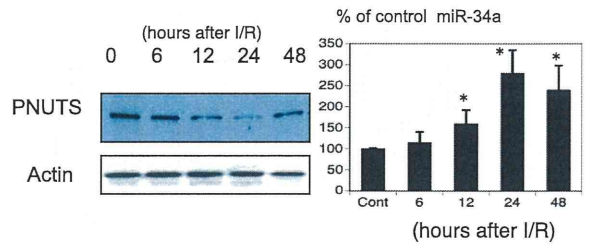




背景

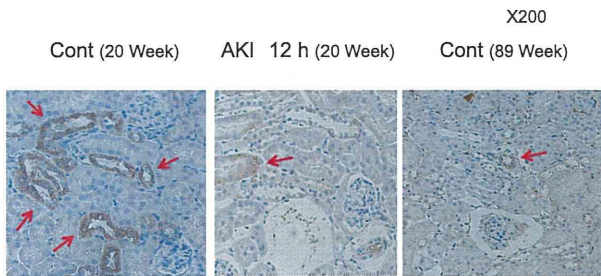
- 加齢と虚血による腎機能低下と高血圧にいたる機序は不明な点が多い。急性腎障害(AKI)の発症頻度は高齢者に多く、60歳以上では14%に至る(Ohtomo k et al., submitted)が、そのメカニズムは不明な点が多い。
- MicroRNAは様々な病態だけでなく、加齢などにより調整され種々の蛋白発現をコントロールする事が報告されている。MicroRNA(miR)-34aは、近年DNA修復に関連するphosphatase 1 nuclear-targeting subunit(PNUTS,別名PPP1R10)を標的とする事が報告された (Nature 495, 107, 2013)。
- 今回の研究では、マウスAKIモデルと培養尿管細胞を用いて、miR-34aとPNUTSの加齢およびAKIでの変化を検討した。

Western blot of PNUTS (also known as PPP1R10; protein phosphatase 1 regulatory subunits 10) and RT-PCR of miR-34a in AKI



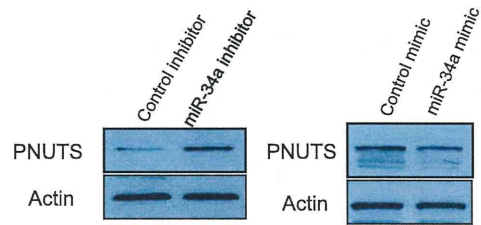
The left renal artery was clamped for 60 min and the left kidney was excised at 0, 6, 12, 24, and 48h after reperfusion. Western blot analysis was used to detect the protein levels of PNUTS and Actin. miR-34a was detected using RT-PCR. (\*p<0.05 v.s. 20 control)

PNUTS positive cells are decreased in proximal tubules I/R-induced AKI (12h) and aged kidney (89 week)



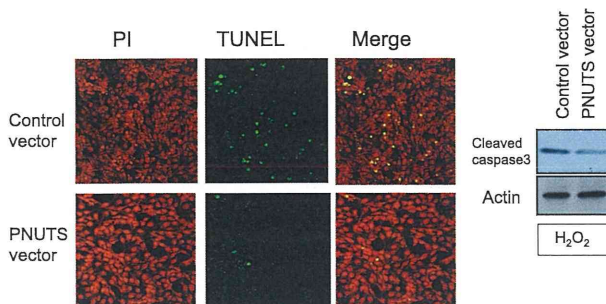
Immunohistochemical analyses of the renal cortex were performed with PNUTS antibodies at 12 h after ischemic injury. The arrows indicate PNUTS positive cells.

miR-34a regulates protein expression of PNUTS in NRK-52E cell



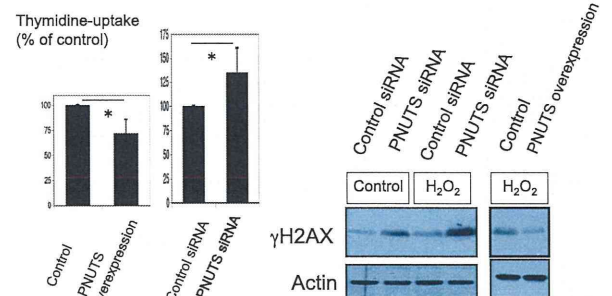
(Left) The effects of miR-34a inhibitor on PNUTS expression in NRK cells. (Right). The effects of miR-34a mimic on PNUTS expression in NRK cells.

Overexpression of PNUTS decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in renal tubular cells.



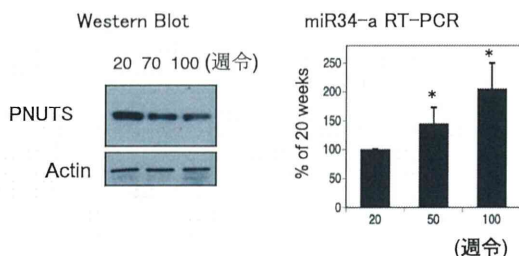
After transfection of plasmid, NRK-52E cells were exposed 400μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6h.

PNUTSはNRK-52E cellで細胞周期を抑制し、DNA障害を軽減する



(Left) The effects of PNUTS expression on Thymidine-uptake in NRK cells. (n=5, mean ± SEM, \*p<0.05 v.s. control.) (Right). The effects of PNUTS expression on γH2AX expression in NRK cells.

加齢によりPNUTSの蛋白発現量は低下し、miR-34aは亢進する

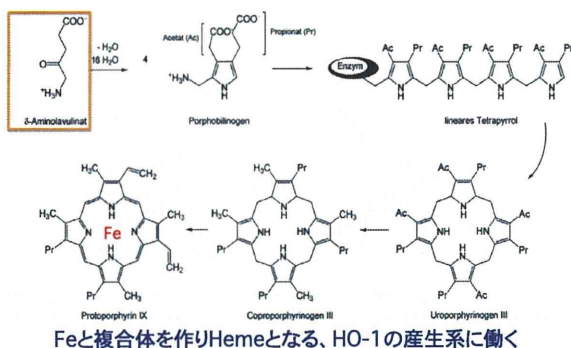


The renal protein and mRNA were obtained from 20, 50, 100 weeks-aged mice. Western blot analysis was used to detect the protein levels of PNUTS and Actin. miR-34a was detected using RT-PCR. n=5, mean ±SEM, \*p<0.05 v.s. 20 weeks

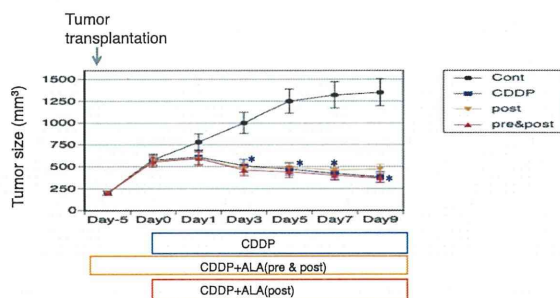
## PNUTSの結語

加齢および低酸素においてmiR-34aは亢進し、PNUTSは発現低下した。これらの系がCaspase活性の変化を含めて加齢とAKIの病態に重要な働きをしている可能性が示唆された。

## 5-Aminolevulinic acid(ALA) protects against cisplatin-induced nephrotoxicity



## Effects of ALA on anti-tumorinogenic effects of cisplatin in vivo.



Tarada Y., et al  
PloS One 2013

## 来年度計画

- 電子カルテ上の78626人のデータを解析して、AKIのリスク因子の詳細な解析を行う。
  - 薬剤性腎障害の頻度の詳細な解析
  - 高リスク群への腎障害性薬剤投与時のアラームの開発。
  - CKDからAKIを発症するリスク因子と予後の解析
- ALAのAKI治療薬としての可能性
  - 臨床治験
- 加齢関連遺伝子のAKIへの関与

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）  
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）による腎尿細管障害研究報告

研究分担者

各務博	新潟大学	呼吸器感染症内科	准教授
斎藤亮彦	新潟大学	機能分子医学講座	教授
田邊嘉也	新潟大学医歯学総合病院	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に存在し様々な尿中物質の再吸収に関わっている。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にし、薬剤性腎障害早期診断マーカー、薬剤性腎障害予防法、予防薬を明らかにすることをその目的としている。これまでの研究において、水晶振動子マイクロバランス法によりシスプラチンがメガリンリガンドであることを明らかとした。この研究成果をもとに、シスプラチン投与を行った呼吸器悪性腫瘍患者 25 名からインフォームド・コンセントの上で尿検体を採取し解析を行った。この結果、25 例中 4 例で 30%以上の s-Cre 上昇が認められた。シスプラチン投与前尿中 A-megalin(細胞外ドメイン型メガリン)/Cre 値はシスプラチン腎症による Cre 上昇( $p=0.0064$ )、eGFR 低下( $p=0.0026$ )と有意な相関を有していた。シスプラチン投与後 24 時間以内に見られる尿細管細胞障害マーカー、 $\alpha 1$ -microglobulin( $p=0.0016$ )、 $\beta 2$ -microglobulin( $p=0.0004$ )のピーク値とも高い相関関係を示した。ROC 解析の結果、Riffle 分類により AKI と診断した症例に対して  $p=0.049$  と有意で、159.2 (pmol/g)を閾値とすると感度 72.7%、特異度 99.9%であった。以上の結果は、尿中 A-megalin がシスプラチン腎症を予測するバイオマーカーとなりうることを示唆している。また、シスプラチン投与前の尿中 A-megalin 量が尿細管細胞におけるメガリン発現量を反映しているとすれば、メガリンを介したシスプラチン再吸収が腎障害を惹起している可能性が高く、メガリン阻害剤がシスプラチン腎症予防薬となりうることを示しているものと考えられた。

#### A. 研究目的

シスプラチンは肺癌、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。用量規定毒性は腎障害であり、予防策を講じて 5%程度は腎不全を生じる。近位尿細管障害を主な障害部位とするが詳細なメカニズムは未だ明らかではない。メガリンは近位尿細管細胞の管腔側に存在し様々な尿中物質の再吸収に関わっている。私達はこれ

までに水晶振動子マイクロバランス法によりシスプラチンがメガリンリガンドであることを明らかにした。シスプラチンによる腎障害とメガリンの関係を明らかにすることを目的として、シスプラチンを投与する呼吸器悪性腫瘍患者における尿中メガリン定量及び腎尿細管細胞障害マーカーの動態を検討した。

## B. 研究方法

平成 25 年 1 月から 12 月までに新潟大学医歯学総合病院に入院し、シスプラチン併用の化学療法を受けた 25 名の呼吸器悪性腫瘍患者よりインフォームド・コンセントの上、経時的に尿検体を採取した。尿中の全長型メガリン (C-megalin)、細胞外ドメイン型メガリン (A-megalin)、NAG、 $\alpha$ 1-microglobulin、 $\beta$ 2-microglobulin、Cre、albumin の定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会により承認を得ている。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

表1

No.	Sex	Age	BL	BW	Diagnosis	regimen (mg/m <sup>2</sup> )	(mg/m <sup>2</sup> )	(mg/kg)
1	F	62	156.2	42.4	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500Bevacizumab
2	F	66	152.2	48.7	SCLC	ODDP	80Etoposide	100 (d1,2,3)
3	M	64	165.2	44.3	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
4	F	65	164	70	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500Bevacizumab
5	F	55	163.2	62.5	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500Bevacizumab
6	F	73	158	43.4	atypical carcinoid	ODDP	80Etoposide	100 (d1,2,3)
7	M	65	156.5	57.8	LNCC	ODDP	80Etoposide	100 (d1,2,3)
8	M	64	167.4	45.1	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
9	M				NSCLC	ODDP	80Gemotabin	1000 (d1, 8)
10	M	65	155	50.4	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
11	F	65	151	51.6	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
12	M	78	161	53.2	NSCLC	ODDP	80Gemotabin	1000 (d1, 8)
13	M	66	172.7	59.3	NSCLC	ODDP	40 (d1, 8) DTX	50 (d1, 8) TRT
14	M	63	169.7	71	MPM	ODDP	80Gemotabin	1000 (d1, 8)
15	M	57	165	60	NSCLC	ODDP	80VNR	25 (d1, 8)
16	M	56	169.7	60.2	SCLC	ODDP	80Etoposide	100 (d1,2,3)
17	M	73	173.8	50.9	NSCLC	ODDP	75Gemotabin	1250 (d1, 8)
18	M	59	167.5	57.1	NSCLC	ODDP	80DTX	60
19	F	68	148	61.4	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
20	M	67	169	79.8	NSCLC	ODDP	75Gemotabin	1250 (d1, 8)
21	M	69	162.6	57.2	NSCLC	ODDP	75Gemotabin	1250 (d1, 8)
22	M	73	171.5	81.7	SCLC	ODDP	60OPT-11	60 (d1, 8, 15)
23	M	67	175	50	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500
24	M	58	163.2	45	NSCLC	ODDP	75Pemetrexed	500Bevacizumab
25	M	62	170.3	79.3	SCLC	ODDP	80Etoposide	100 (d1,2,3) TRT

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer  
 SCLC: Small Cell Lung Cancer  
 LNCC: Large Cell Neuroendocrine Cancer

表 1 に示す 25 症例において解析を行った。尿中 C-megalin/Cre はシスプラチン投与 24 時間以内にピークを有しており、尿中 A-megalin/Cre は 2-3 日後に最大値を有していた。25 症例中 4 例で s-Cre 30%以上の増加を認め Riffle 分類における AKI と診断した。s-Cre 上昇はシスプラチン投与後 7-10 日後に生じており既報と一致していた。NAG、 $\alpha$ 1-microglobulin、 $\beta$ 2-microglobulin といった尿細管細胞障害マーカーはシスプラチン投与後 24 時間以内にピークを有しており、C-megalin の動態に一致していた。

シスプラチン投与前尿中 A-megalin/Cre 値は s-Cre 増加率 ( $r=0.523$ ,  $p=0.0064$ )、eGFR 低下値 ( $r=-0.573$ ,  $p=0.0028$ )と有意に相関していた (図 1 左)。尿細管細胞障害マーカーのうち、 $\alpha$ 1-microglobulin ( $r=0.732$ ,  $p=0.0004$ )、

$\beta$ 2-microglobulin ( $r=0.672$ ,  $p=0.0016$ )の投与後最大値とシスプラチン投与前尿中 A-megalin/Cre 値も強い相関を示した (図 1 右)。

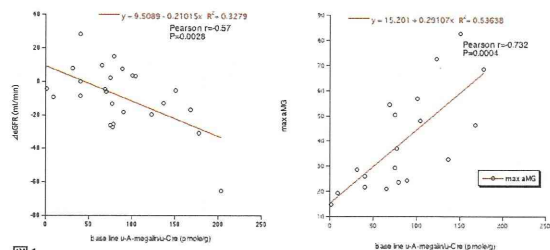


図1

## D. 考察

尿中 C-megalin は尿細管細胞障害マーカーとされる NAG、 $\alpha$ 1-microglobulin、 $\beta$ 2-microglobulin の動態と近似しており、シスプラチン投与後 24 時間以内に生じている尿細管細胞障害を反映していることが示唆された。

尿中 A-megalin は C-megalin と全く異なった動態を示し、シスプラチン投与後 2-3 日目に増加した。尿中アルブミン増加が 5-6 日目に生じていることから、尿細管の再吸収能の異常を反映している可能性があるものと考えた。

興味深いことに、シスプラチン投与前の尿中 A-megalin 値は、シスプラチン投与後 s-Cre 上昇率と正の相関、eGFR と負の相関を示した。尿細管細胞障害マーカーのシスプラチン投与後最大値とも強い相関関係を示した。s-Cre 50%上昇、eGFR 25ml/min 低下という Riffle 分類で AKI と診断できる症例との関連を ROC 解析したところ、 $p=0.049$  で有意であり、159.2 (pmol/g)を閾値とすると感度 72.7%、特異度 99.9%であった。以上より、尿中 A-megalin はシスプラチンによる近位尿細管障害を予測するバイオマーカーとなりうるということが示唆された。

尿中 A-megalin 量が尿細管細胞におけるメガリン依存性シスプラチン再吸収率を反映しているとすれば、メガリン依存性のシスプラチン再吸収がシスプラチンによる尿細管細胞障害のメカニズムに大きく関与していることとなり、メガリン阻害剤がシスプラチン腎症を予防する効果を有することが期待される。

## E. 結論

尿中 C-megalin はシスプラチンによる尿細管細胞障害を反映するマーカーとなりうること、シスプラチン投与前尿中 A-megalin はシスプラチン腎症発症を予測するバイオマーカーとなりうることが明らかとなった。今後は、さらに症例を積み重ねるとともに、メガリン結合を阻害する薬剤を用いたシスプラチン腎症予防法の開発を目指す。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし。

2. 学会発表  
特になし。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

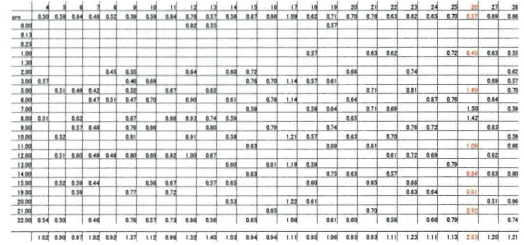
特になし。

表1

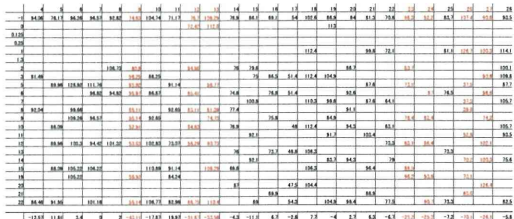
No.	Sex	Age	BL	BW	Diagnosis	regimen	mg/m <sup>2</sup>	mg/kg	mg/kg
1	F	62	155.2	42.4	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500Bexacuzumab	15
2	F	66	152.2	48.7	NSCLC	COOP	80Etoposide	100 (s1,2,3)	
3	M	64	166.2	44.3	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	500
4	F	65	164	70	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500Bexacuzumab	15
5	F	55	163.2	62.5	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500Bexacuzumab	15
6	F	73	156	43.4	epidermal carcinoma	COOP	80Etoposide	100 (s1,2,3)	
7	M	66	156.9	57.8	LCNEC	COOP	80Etoposide	100 (s1,2,3)	
8	M	64	167.4	45.1	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	
9	M				NSCLC	COOP	80Gemtastin	1000 (s1, 8)	
10	M	65	156	50.4	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	
11	F	60	151	51.8	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	
12	M	78	161	53.2	NSCLC	COOP	80Gemtastin	1000 (s1, 8)	
13	M	66	172.7	59.3	NSCLC	COOP	40 (s1, 8) DTX	90 (s1, 8) TRT	
14	M	63	166.7	71.4	NSCLC	COOP	80Gemtastin	1000 (s1, 8)	
15	M	57	165	80	NSCLC	COOP	80VINR	25 (s1, 8)	
16	M	56	169.7	60.2	NSCLC	COOP	80Etoposide	100 (s1,2,3)	
17	M	73	173.8	50.9	NSCLC	COOP	75Gemtastin	1250 (s1, 8)	
18	M	58	167.6	57.1	NSCLC	COOP	80DTX	60	
19	F	68	148	61.4	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	
20	M	67	169	79.8	NSCLC	COOP	75Gemtastin	1250 (s1, 8)	
21	M	69	182.6	67.2	NSCLC	COOP	75Gemtastin	1250 (s1, 8) Neodumumab 800mg/body	
22	M	73	171.6	61.7	NSCLC	COOP	60ICP1-11	60 (s1, 8, 15)	
23	M	67	175	50	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500	
24	M	58	163.2	45	NSCLC	COOP	75Pemetrexed	500Bexacuzumab	15
25	M	62	170.3	79.3	NSCLC	COOP	80Etoposide	100 (s1,2,3) TRT	

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer  
 COOP: Cisplatin  
 SCLC: Small Cell Lung Cancer  
 LCNEC: Large Cell Neuroendocrine Cancer

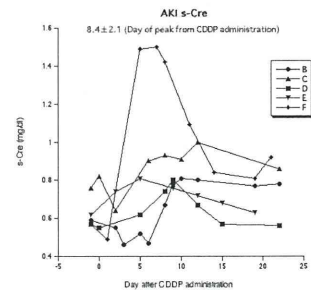
CDDP投与後s-Creの推移 (赤字はbase lineに比して50%以上の上昇を認めた症例)



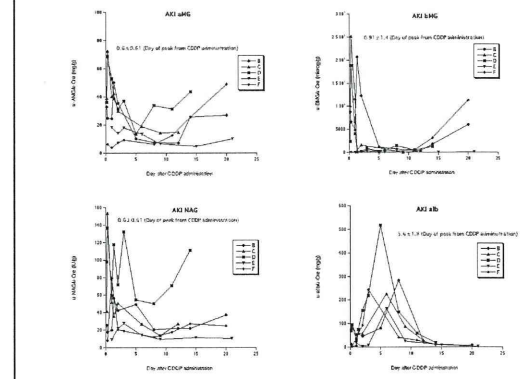
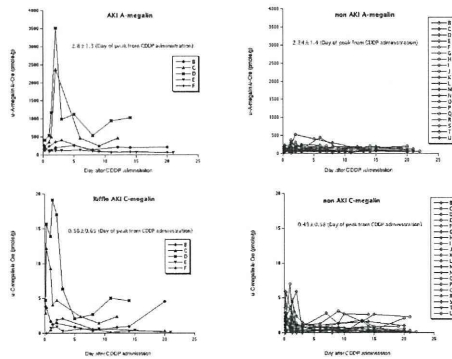
CDDP投与後eGFRの推移

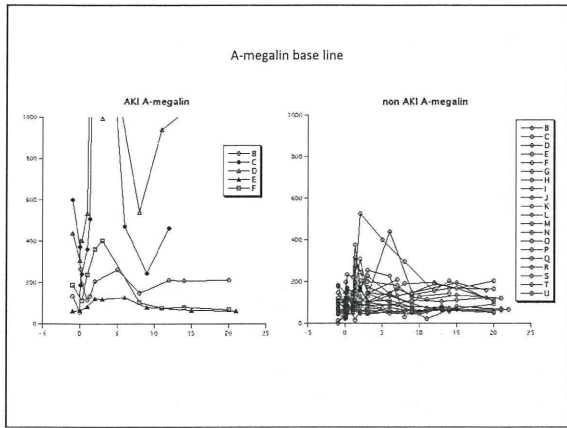


Cre上昇を認めた症例のs-Cre推移



CDDP投与後尿中メガリン量変化





### CDDPによるeGFR変化と各種マーカーとの相関関係

Parameter	max A-megalin	max C-megalin	max MMD	max aMS	max MMD	max u-Cre	max A-megalin	max uB
r	-0.201	-0.441	-0.344	-0.347	-0.368	-0.374	-0.374	-0.374
95% confidence interval	-0.318 to -0.128	-0.561 to -0.321	-0.427 to -0.261	-0.427 to -0.267	-0.453 to -0.283	-0.453 to -0.283	-0.453 to -0.283	-0.453 to -0.283
P value	0.0009	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
P (two-tailed)	0.0018	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008
P value summary	ns	**	**	**	**	**	**	**
Significant (alpha = 0.05)	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Number of XY Pairs	25	19	19	19	19	24	24	25

CDDP投与後最大変化値でeGFR変化と有意な相関を示したものは、従来の尿細管細胞障害マーカーである、β2microglobulin, α1microglobulin, NAGとuB値であった。

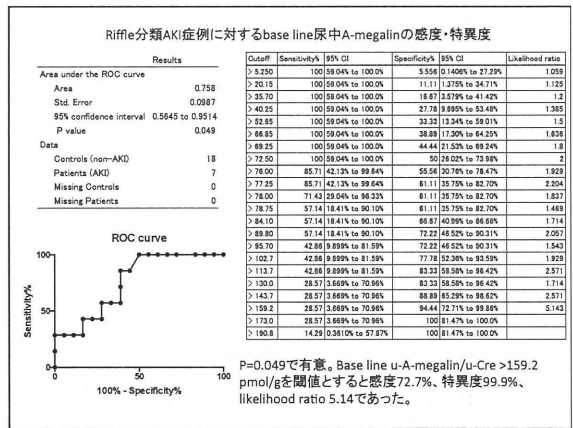
Parameter	max A-megalin	max C-megalin	max MMD	max aMS	max MMD	max u-Cre	max A-megalin	max uB
r	-0.219	-0.242	-0.228	-0.311	-0.244	-0.242	-0.242	-0.242
95% confidence interval	-0.383 to -0.055	-0.417 to -0.067	-0.359 to -0.097	-0.417 to -0.205	-0.279 to -0.209	-0.383 to -0.055	-0.383 to -0.055	-0.383 to -0.055
P value	0.0219	0.0041	0.0008	0.0019	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009
P (two-tailed)	0.0438	0.0082	0.0176	0.0381	0.0198	0.0198	0.0198	0.0198
P value summary	ns	**	**	**	**	**	**	**
Significant (alpha = 0.05)	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Number of XY Pairs	25	21	21	21	21	21	21	25

一方、CDDP投与前の値でeGFR変化と有意な相関を示したものは、A-megalinとuBのみであった。

### CDDP投与後s-Cre変化率と各種マーカーとの相関

Parameter	max A-megalin	max C-megalin	max MMD	max aMS	max MMD	max u-Cre	max A-megalin	max uB
r	0.226	0.217	0.228	0.204	0.212	0.217	0.217	0.217
95% confidence interval	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349	0.103 to 0.349
P value	0.004	0.002	0.007	0.015	0.015	0.007	0.007	0.007
P (two-tailed)	0.008	0.004	0.014	0.030	0.030	0.014	0.014	0.014
P value summary	**	**	**	**	**	**	**	**
Significant (alpha = 0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Number of XY Pairs	25	21	21	21	21	21	21	25

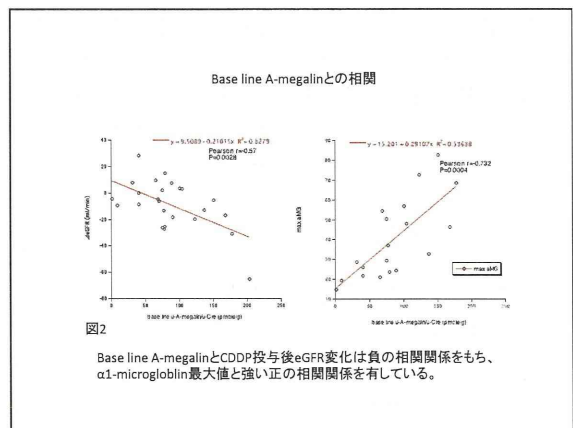
eGFR変化との相関同様、base lineの値でs-Cre変化率と有意な相関を持つのは、A-megalinとuBであった。



### Base line A-megalinとCDDP投与後最大変化値との相関

Parameter	max A-megalin	max C-megalin	max MMD	max aMS	max MMD	max u-Cre	max A-megalin	max uB
r	0.472	0.488	0.572	0.524	0.468	0.467	0.467	0.467
95% confidence interval	0.2808 to 0.7232	0.2808 to 0.7232	0.3418 to 0.8042	0.3418 to 0.8042	0.2808 to 0.7232	0.2808 to 0.7232	0.2808 to 0.7232	0.2808 to 0.7232
P value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
P (two-tailed)	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
P value summary	**	**	**	**	**	**	**	**
Significant (alpha = 0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Number of XY Pairs	25	21	21	21	21	21	21	25

Base line A-megalinは従来の尿細管細胞障害マーカーの中で、β2microglobulin, α1microglobulinとuBの最大値と有意に相関している(尤も最大値とは相関がなかった)。最も強い相関を示したものは、α1microglobulin最大値であり、r=0.732という強い相関を示した。





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

研究課題：尿細管障害の機序の解明と治療法の基礎的検討

研究分担者 斎藤亮彦

新潟大学・機能分子医学講座・教授

研究要旨：

メガリンは近位尿細管上皮細胞(PTEC)の管腔側に発現し、糸球体を濾過する様々な物質の再吸収を司るエンドサイトーシス受容体である。本研究は、メガリンがコリスチン、シスプラチン、バンコマイシンの腎毒性機序に関わるかについて検討するとともに、メガリン拮抗薬を用いてそれらによる腎毒性を予防する新たな治療法を開発を行うことである。本研究において、メガリンとコリスチン、シスプラチン、バンコマイシンが直接結合することを、水晶振動子マイクロバランス法を用いて明らかにした。メガリン拮抗薬候補 X についても、メガリンとの直接的な結合を見いだすと同時に、コリスチン、シスプラチン、バンコマイシンのメガリン結合を阻害することを明らかにした。2) 腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウスを用いて、コリスチンの腎毒性がメガリン依存性であることを見いだした。3) 野生型マウスにおいて、コリスチンによる腎毒性は、メガリン拮抗薬 X の同時投与により軽減されることを明らかにした。4) メガリン拮抗薬 X はコリスチンの抗菌活性を抑制しなかった。以上により、メガリン拮抗薬 X は薬剤性腎障害の有望な予防薬となる可能性がある。今後は尿中メガリン測定を含め PMDA 相談を行う準備を進める。

A. 研究目的

メガリンは近位尿細管上皮細胞(PTEC)の管腔側に存在し、糸球体を濾過する様々な物質の再吸収を司るエンドサイトーシス受容体である。メガリンは以前よりアミノグリコシドなどの腎毒性薬剤の PTEC への取り込みに関わることが明らかにされていた。本研究では、メガリンがその他の薬物（コリスチン、シスプラチン、バンコマイシンなど）の腎毒性に関わるかについて検討するとともに、メガリン拮抗薬を用いてそれらによる腎毒性を予防する新たな治療法を開発を目指す。

B. 研究方法

特に、多剤耐性緑膿菌感染症に対する特効薬であるが、その腎毒性が問題となっているコリスチンについて、メガリンとの直接結合の有無を、水晶振動子マイクロバランス法を用いて解析した。さらに腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウス（約 60%の PTEC でメガリンがノックアウト）を用いて、コリ

スチンによる腎毒性のメガリン依存性を検討した。また、メガリン拮抗候補薬を用いて、コリスチンのメガリン結合を阻害できるか、さらに野生型マウスにおいて、コリスチンによる腎毒性を軽減できるか、について検討した。さらに、臨床的に腎毒性が問題となっている他の薬物（バンコマイシン、シスプラチンなど）についても同様の検討を行った。また、メガリン拮抗候補薬がコリスチンの抗菌活性を阻害しないことを確認するため、大腸菌を培養したプレート上の増殖阻止円の検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) 水晶振動子マイクロバランス法を用いて、メガリンと腎毒性薬物（コリスチン、シスプラチン、バンコマイシン）が直接結合することを見いだした。メガリン拮抗薬候補 X

についても、メガリンとの直接的な結合を見いだすとともに、コリスチン、シスプラチン、バンコマイシンのメガリン結合を阻害することを明らかにした。

2) 腎特異的モザイク型メガリンノックアウトマウスにコリスチンを投与すると、メガリン発現性 PTEC において、細胞質内の空胞変性所見が認められるとともに KIM-1 (腎傷害マーカー) が発現するが、メガリンがノックアウトされた PTEC においては KIM-1 が発現しないことを見いだした。

3) 野生型マウスにコリスチンを投与することによって生ずる腎傷害は、メガリン拮抗薬 X の同時投与により軽減されることを病理学および生化学的 (KIM-1 発現の抑制) に明らかにした。

4) メガリン拮抗薬 X はコリスチンの大腸菌に対する抗菌活性を抑制しなかった。

#### D. 考察

コリスチンはメガリンに直接結合し、PTEC に取り込まれることによって、メガリン依存性に腎毒性を惹起する可能性が高い。メガリン拮抗薬 X はコリスチンのメガリン結合を阻害することにより、その腎毒性を軽減する可能性がある。さらにメガリン拮抗薬 X はコリスチンの抗菌活性を抑制しないことから、臨床的に有効な予防薬になる可能性がある。さらにメガリン拮抗薬 X はシスプラチン、バンコマイシンのメガリン結合も阻害することから、それらの薬剤による腎毒性を軽減させる効果が期待されるので、コリスチンと同様の解析を進める予定である。

メガリン拮抗薬については、国内特許出願に続いて、味の素製薬と PCT 出願を行った。

また本研究事業において、私たちは、尿中メガリン (A-megalin) はシスプラチン腎症の発症予測因子となることを明らかにした。このことから、尿中メガリン測定は、薬剤性腎障害のメガリン拮抗薬による予防治療に対するコンパニオン診断に応用される可能性が高い。今後、PMDA の対面相談を経て、AMED に申請し、国内臨床試験を進める方向で調整する。

#### E. 結論

メガリン拮抗薬 X はコリスチンの腎毒性に対する予防薬になる可能性がある。さらにメガリン拮抗薬 X はシスプラチン、バンコマイシンの腎毒性を予防することも期待される。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

2. 学会発表

第 44 回 日本腎臓学会 東部学術大会  
2014. 10. 24-25

齋藤亮彦：薬剤性腎障害とメガリン

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

発明者：齋藤亮彦、青木信将、堀好寿、桑原  
頌治、細島康宏、岩田博司、松田砂織

発明の名称：メガリン拮抗剤

共同権利者：新潟大学、味の素株式会社

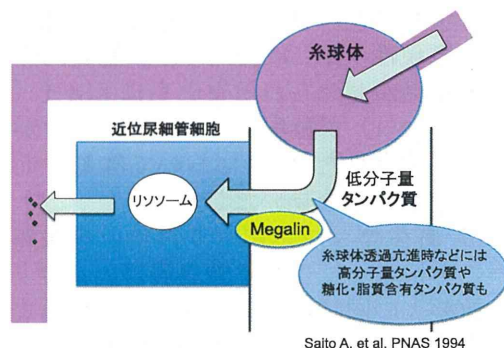
出願日：2015年1月22日

出願番号：PCT/JP2015/51718

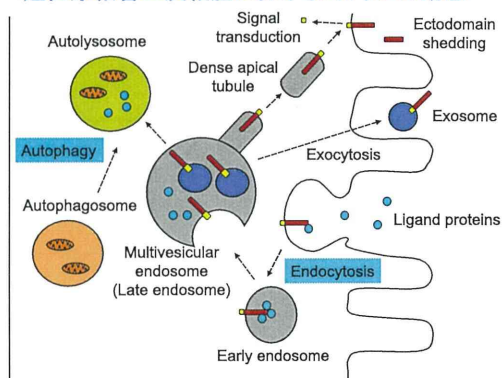
# 薬剤性腎障害とメガリン

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
機能分子医学講座  
斎藤 亮彦

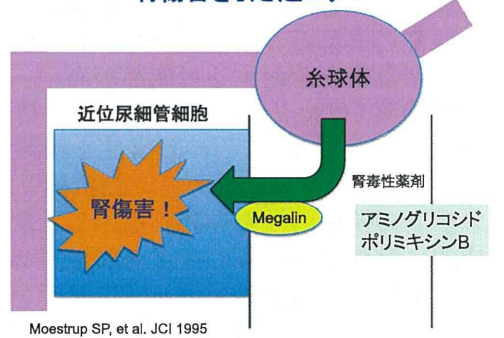
## 近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリン



## 近位尿細管上皮細胞におけるメガリンの動態



## メガリンはある種の腎毒性薬剤を取り込み腎傷害を引き起こす



## グラクソ・スミスクライン株式会社、多剤耐性緑膿菌感染症に対する治療薬としてコリスチンの製造販売承認を申請 (プレスリリース 2014.8.13)

「グラクソ・スミスクライン株式会社(社長:フィリップ・フォシェ、本社:東京都渋谷区、以下GSK)は、8月13日付で、ポリペプチド系抗生物質製剤コリスチンメタンシルホン酸ナトリウム注射剤(一般名、以下コリスチン注射剤)について、多剤耐性緑膿菌感染症の治療薬として厚生労働省に製造販売承認申請を行いました。

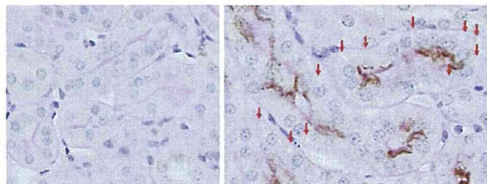
コリスチン注射剤は社団法人日本化学療法学会から多剤耐性緑膿菌由来感染症の治療薬として再開発の要望が厚生労働省に提出されていました。これを受け、厚生労働省は、コリスチン注射剤を未承認薬・適応外薬検討会議で医療上の必要性が高い薬剤と判断し、開発企業を公募しました。GSKは本剤の医療上の必要性を鑑み、この公募に応じ、開発に着手しました。

近年、緑膿菌の多剤耐性化が進行しており、治療薬の選択肢が限られるなど、臨床上の大きな課題となっています。コリスチン注射剤は、国内において、1990年代半ばまで臨床に供されていましたが、使用量の減少とともに、承認削除されていました。しかしながら、国内外のガイドラインにおいては、多剤耐性緑膿菌感染症に対する治療薬の最終救済薬として再評価されています。」

**腎障害の解決が喫緊の課題!**

## コリスチンを投与されたApoE-cre Megalin KOマウスの腎組織 (メガリン免疫+PAS染色)

メガリン発現がKOされた近位尿細管細胞      メガリン発現が残存した近位尿細管細胞



メガリンを発現する近位尿細管細胞は、発現がKOされている近位尿細管細胞と比較し、細胞質内に多数の空胞(↓)を認める。  
⇒コリスチンによる近位尿細管細胞障害はメガリン依存性

