博士論文

# 新規腎乳頭部壊死バイオマーカーの検索
（要約）

平成 29 年度

東北大学大学院薬学研究科

生命薬学専攻

佐々木　大祐

薬剤によって惹起される腎障害として，近位尿細管や糸球体等の障害がよく知られている。一方，腎乳頭部壊死はその頻度が低いものの深刻な腎障害の一種とされており，非ステロイド性抗炎症薬の長期服用や糖尿病等で認められる。また，薬剤開発過程での動物を用いた毒性試験においてもしばしば認められる腎障害の一種であり，特にラットにおいて生じやすいとされている。近位尿細管等の他の腎臓内部位と比較して腎乳頭部は再生性に乏しいため，腎機能の低下に直接つながる深刻な腎障害として捉えられている。

腎毒性の評価に尿試験紙法による尿蛋白質，pH，潜血，グルコース等の測定や，血液尿素窒素（blood urea nitrogen ; BUN）および血清クレアチニン等の血液生化学パラメータが一般的に用いられている。近年，非臨床においては，コンソーシアムから提案された複数の腎障害バイオマーカーの毒性試験での使用が日本，米国，欧州の規制当局によって承認され，また臨床においては，体外診断薬として承認を取得，或いは申請中のバイオマーカーが国際的腎臓病ガイドライン機構による急性腎障害ガイドラインに記載される等，腎障害という大きな括りにおいては臨床・非臨床共に性能の良い有用なバイオマーカーが充実しつつある。しかし，それらのほとんどは主に近位尿細管障害に対応するバイオマーカーであり，糸球体障害や遠位尿細管障害に使用可能なものも幾つか含まれているものの，腎乳頭部壊死に使用可能とされているバイオマーカーは，renal papillary antigen-1（RPA-1）のみである。RPA-1 はラットの腎乳頭部の組織を抗原として作製した抗体によって検出される物質で，高分子量の蛋白質複合体であると推測されているが，ヒトや他の動物種における RPA-1 の存在は未だ不明である。そこで本研究では，腎乳頭部壊死を容易に検出・モニタリングでき，かつ，ヒトでの存在が確認されているバイオマーカー候補蛋白質をプロテオミクス解析により検索した。

検索には，2-bromoethylamine hydrobromide（BEA）投与による腎乳頭部壊死モデルラットを使用した。BEA（0, 3, 10, 30, 100 mg/kg）を Sprague Dawley 系雄ラットに単回投与して 24 時間後に剖検したところ，30 mg/kg 以上の BEA 投与群で腎乳頭部壊死が認められた。BEA 投与直後から 24 時間までに得た蓄尿中の蛋白質を LC-MS/MS を用いて比較定量分析したところ，腎乳頭

部壊死においてレベルの増加が認められるバイオマーカー候補蛋白質 77 種が同定された。同定した候補蛋白質の中には既に腎障害バイオマーカーとして使用されている蛋白質や腎障害との関連が報告されている蛋白質が複数含まれていた。このことは，本研究で用いた検索方法の信頼性の高さを示しており，今回同定された蛋白質の中に有用な腎障害バイオマーカーが含まれている可能性が考えられた。

上記の 77 種のバイオマーカー候補蛋白質の中から，腎乳頭部壊死が確認されたラット尿中での増加割合が高く，かつ，比較的定量が容易と考えられる 25 種の蛋白質を選択して個別定量を行った。ラットに BEA（30 mg/kg）を単回投与すると上述のように 24 時間後に乳頭部壊死の病理組織像が認められるが，投与 6 時間後においては腎乳頭部壊死は認められず，集合管の尿細管拡張のみが認められた。そこで，BEA 投与後 6 時間の蓄尿中に存在する 25 種のバイオマーカー候補蛋白質のレベルを調べたところ，sialate-*O* acetylesterase（SIAE）のみが 30 mg/kg 以上の BEA 投与群で有意に増加していた。BEA の投与 6 時間後では腎乳頭部壊死が観察されないことから, SIAE は腎乳頭部壊死が顕在化する前に増加する蛋白質である可能性が考えられる。また，腎乳頭部壊死が顕在化した BEA 投与後 6 時間から 24 時間の蓄尿中で 25 種の蛋白質の全てが増加したことから，今回行ったプロテオミクス解析法が BEA 投与によって増加する蛋白質を精度良く検出できる優れた方法であることが示された。

腎乳頭部壊死に対するバイオマーカーとしての SIAE の有用性を検討するために, 糸球体障害モデルとしてピューロマイシン投与ラットを，近位尿細管モデル動物としてゲンタマイシン投与ラットおよびシスプラチン投与ラットを用いて SIAE レベルの変動を検討した。その結果，いずれの腎臓内部位の障害においても SIAE のレベルが増加したことから，SIAE は腎乳頭部壊死のみで増加する蛋白質ではないと考えられる。しかし，BEA 投与ラットにおける SIAE の増加割合は他の腎障害誘発化合物を投与したラットに比べて顕著に高かった。このことから，SIAE は腎乳頭部壊死に対して特に鋭敏なバイオマーカーである可能性が考えられる。

低用量シスプラチンの反復投与（1 日 1 回ずつ 1〜7 日間連続投与）により得られた尿につい

て SIAE と共に，既存バイオマーカーの中で近位尿細管障害を検出する性能が高く，毒性評価にも近年よく用いられている KIM-1 を性能比較のために測定した。その結果, 尿中 SIAE は 1 mg/kg のシスプラチンを 3 日間以上反復投与した際に増加が認められたが，3 日間反復投与時は 1 個体でのみ特に顕著に SIAE が上昇していた。一方，尿中 KIM-1 は，1 mg/kg のシスプラチン投与群において，組織変化よりも早い単回投与時から増加し，それより少ない用量である 0.5 mg/kg でも 3 日間以上の反復投与時に増加傾向が認められた。したがって，少なくともシスプラチンによる近位尿細管障害の検出に関しては，早期変動性という観点において SIAE は KIM-1 を上回ることはできないと考えられる。

次に低用量 BEA の反復投与後により得られた尿について上記と同様の検討を行った。尿中 SIAE は 20 mg/kg の BEA の単回投与時から増加傾向を示し，3 日間反復投与時には有意な増加が認められたが，7 日間反復投与においては対照群と同等のレベルまで低下した。一方，既存の腎乳頭部壊死バイオマーカーである RPA-1 は BEA（20 mg/kg）の 3 日間以上の反復投与によって増加傾向を示し，7 日間反復投与時には有意に増加した。KIM-1 は 20 mg/kg の BEA を 3 日間反復投与した際に増加傾向が示されたが，変動を示したラットは 1 個体のみであった。以上の結果から, SIAE は腎乳頭部壊死に対する既存のバイオマーカーである RPA-1 に比べて早期に応答する鋭敏なバイオマーカーである可能性が考えられる。

本研究での検討により, SIAE は既存バイオマーカーの RPA-1 よりも早期に腎乳頭部壊死を検出可能な，腎乳頭部壊死バイオマーカーとして応用できる可能性が示された。前述のように，RPA-1 は蛋白質として同定されていないことから，現状ではラットに特異的な腎乳頭部壊死バイオマーカーであり，ヒトには適用できない。一方，SIAE はイヌやサル，ヒトにも存在することが知られているため，ヒトをはじめ多くの動物に利用可能と考えられる。また，SIAE は腎乳頭部壊死を他の部位の障害よりも鋭敏に検出できるバイオマーカーであることが確認されたことから，他の障害部位特異的なバイオマーカー等と組み合わせることによって腎障害時の腎臓内障害部位を推定するためのバイオマーカーとなり得ると考えられる。

今後，尿中 SIAE のラット以外での動物種での有用性を明らかにすると共に，簡便な尿中 SIAE 測定法を確立することによって，臨床・非臨床における腎乳頭部壊死をより簡便かつ早期に検出できるようになり，乳頭部壊死の発現が懸念される薬剤の開発や腎乳頭部壊死の診断や治療への利用が期待される。