

# ヒトL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)トランスジェニックマウスの樹立と薬物動態学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/26901">http://hdl.handle.net/2297/26901</a>

氏名	中村 和男
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第 1046 号
学位授与の日付	平成20年3月31日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ヒトL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)トランスジェニックマウスの樹立と薬物動態学的研究
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(附属病院・教授), 横井 毅(医学系研究科・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・准教授), 松下 良(自然科学研究科・准教授)

The number of patients with end stage renal failure has been increasing throughout the world. A novel biomarker of renal diseases, liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) is expressed in human proximal tubules. L-FABP binds to cytotoxic lipids or fatty acids in renal proximal tubules, and is excreted into urine. We here generated human L-FABP transgenic mice (Tg mice) with an aim to develop a novel tool to explore nephrotoxic compounds in drug screening. To demonstrate usefulness of the Tg mice, nephrotoxicity of cisplatin was evaluated. Application of cisplatin in cancer chemotherapy has been limited by severe nephrotoxicity. Accumulation of cisplatin was thought to be one of the causes for the nephrotoxicity. In the Tg mice urinary excretion of hL-FABP increased after the administration of cisplatin. Glomerular filtration markers such as BUN and plasma creatinine also increased by cisplatin. However, urinary excretion of hL-FABP in Tg mice was reduced by coadministration of cimetidine, whereas both BUN and creatinine were minimally affected. These results suggest that coadministration of cimetidine reduces renal toxicity of cisplatin with minimal effect on the glomerulus. Thus, the L-FABP Tg mouse is a useful tool to specifically evaluate nephrotoxicity, and further studies are awaited to demonstrate the usefulness of this mouse as a novel drug screening system.

生体に投与された医薬品の多くは未変化体や代謝物として尿中に排泄されるため、腎臓は医薬品の体内動態を考える上で極めて重要な処理臓器である。腎臓の近位尿細管では糸球体濾過によって排泄された化合物の再吸収と、薬物やその代謝産物、外因性物質などの分泌が行われており、不要な物質を体外に除去する役割を担っている。よって医薬品の腎排泄機構の解明はその体内動態や薬効、毒性における個体差、薬物間相互作用もしくは病態時での変動を考える上で必要不可欠である。

一方で腎臓は薬剤感受性遺伝子が多く発現しているため、新薬開発上、腎毒性の回避は重要である。しかしながら現状では、ヒト由来の腎細胞は初代培養細胞等が確立されておらず、LLC-pKI細胞やMDCK細胞など、実験動物腎臓由来の株化上皮細胞が市販されているのみである。従って、前臨床試験の腎毒性ス

クリーニングは、ラットやイヌを用いた動物実験により代用されている。この場合、腎毒性の評価は一般にはBUNやcreatinineなどの生化学パラメータ値によって評価される。しかしながらこれらはいずれも糸球体ろ過のマーカーであり、腎臓特異的な分化機能を有する尿細管の障害やストレスを反映するとは限らない。また、糸球体の濾過機能が破綻した結果として血中から漏出するアルブミンや、再吸収機能が低下した結果として相対的に原尿中で増加する $\beta$ 2MG( $\beta$ 2-microglobulin)、 $\alpha$ 1MG( $\alpha$ 1-microglobulin)、トランスフェリンなどの尿中蛋白質などが知られている。しかし、これらはいずれも糸球体ろ過された後のタンパク質を観察しており、尿細管への毒性を評価するにはそこで生成されるバイオマーカーがより適切と考えられる。

これに対してL-FABPは、これら血中由来の既存の尿中指標とは異なり、近位尿細管上皮細胞そのものに発現しており、尿細管に対する低酸素障害や酸化ストレスに応答して遺伝子発現が誘導され、尿中に排出されるという特徴を有する。L型脂肪酸結合蛋白(L type fatty acid binding protein; L-FABP)は、肝臓、腸および腎臓の近位尿細管細胞の細胞質に局在する分子量約14Kdの脂肪酸結合蛋白で、遊離脂肪酸と結合し、ミトコンドリアやペルオキシソームへ転送することで $\beta$ 酸化を促進することが知られている。アルブミンとともに細胞内に再吸収された遊離脂肪酸をミトコンドリアなどに運び $\beta$ 酸化を促進する。また、L-FABPは過酸化脂質とも結合して細胞外へ排出することにより、腎保護的に働くと考えられている。このことから、尿中に排泄されたL-FABP蛋白が尿細管上皮細胞の損傷のバイオマーカーになると期待されている。尿細管障害の指標として、尿細管刷子縁に局在する酵素であるNAG(N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase)が知られている。NAGは、尿細管組織障害の結果として尿中に逸脱すると考えられているが、その尿中酵素活性がpH変化により容易に失活する点など診断精度としては、必ずしも病態把握に十分とはいえない。尿中L-FABPは、尿細管障害の結果ではなく、その原因となる尿細管に対する微小血行動態の変化や酸化ストレスを反映すると考えられることから、尿細管障害の早期診断に対する高い診断精度が期待される。

ヒト慢性腎疾患に対する薬剤介入試験のモニタリングマーカーとして、尿中L-FABPが有用であるというエビデンスは、スタチン、ARB(angiotensin receptor blocker)、ACEI(angiotensin converting enzyme inhibitor)、PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)作用薬、造影剤腎症などでも相次いで報告されており、その有用性は確立されつつある。一方で急性腎不全マーカーとしてはNGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin)やKIM-1(kidney injury molecule-1)といった新規分子が米国において注目を集めているが、これらの指標は急性腎不全時に尿中で上昇するメカニズムが不明である。前者は好中球に、後者はT細胞に発現が見られるため全身的な炎症時にも陽性となることが疾患特異性の点で問題になると予想される。

このように尿中に排泄された L-FABP 蛋白は、尿細管上皮細胞の損傷のバイオマーカーになると期待されているが、それを実証する動物モデルがなかった。そこで本研究は、L-FABP がヒトとげっ歯類とで遺伝子転写調節領域の構造が異なっており、臓器発現の特異性に大きな違いがある点、すなわち、マウス腎臓においてはヒトとは違い、L-FABP は発現していないことに着目し、hL-FABP の遺伝子転写調節領域を含む染色体遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。作製された hL-FABP Tg マウスの腎臓においては、hL-FABP 遺伝子および蛋白質の発現が共に、ヒト腎臓と同様、近位尿細管に特異的に発現していた。また、腎虚血によって hL-FABP 遺伝子の発現誘導と、それに引き続いて起こる酸化ストレスの上昇に伴い、速やかに hL-FABP 蛋白が尿中排泄されることを明らかとし、L-FABP による腎障害診断のコンセプトを証明した

しかしながら、薬物によって誘起される腎臓の尿細管障害及びその軽減効果と hL-FABP 蛋白の排泄動態については未検討であったため、腎臓の尿細管障害を誘起する抗がん剤 cisplatin に着目し、さらなる検討を行った。Cisplatin は、膀胱がん、大腸がん、肺ガン等の固形ガンに対する薬物治療において重要な役割をする医薬品である。しかし、cisplatin によって誘発される腎毒性によりその使用が制限されているのが現状である。Cisplatin は、投与後腎臓に蓄積し、腎臓においてラジカルや過酸化脂質の過剰生成により腎毒性が起これと考えられている。Cisplatin の腎毒性は、有機カチオンによって軽減され、さらに cisplatin は、腎臓の近位尿細管 basal 側に発現する有機カチオントランスポーター OCT2 の基質である。また、細胞株を用いた輸送実験において、basal 側の輸送は有機カチオンによって阻害される。これらのことから、cisplatin の腎臓近位尿細管上皮細胞への basal 側からの取り込みは、有機カチオントランスポーター OCT2 が関与し、その腎臓内への蓄積が腎毒性に関与すると考えられている。

Tg マウスに cisplatin を投与したところ、尿中 hL-FABP 排泄は顕著に増加したことから、Tg マウスが cisplatin による腎毒性を評価できることが示された。一方で、cisplatin 投与 Tg マウスにおいて、cimetidine 処理によって尿中 hL-FABP 排泄は無処理マウスと比較して有意に減少したが、糸球体機能破綻のマーカーである BUN や血漿中クレアチニンには cimetidine の影響は観察されなかった。一方で動態試験において、cimetidine は cisplatin の血漿中濃度推移や腎臓-血漿中濃度比に影響を及ぼさなかった。また、腎スライスを用いた cisplatin の取り込みにおいて、cimetidine の阻害効果は観察されなかった。以上の結果より、cisplatin によって誘起される腎臓の尿細管障害は尿中 hL-FABP 排泄を促すこと、cimetidine 併用投与によってその排泄が著しく低下したことから、Tg マウスにおける尿中 hL-FABP の測定によって cisplatin による尿細管障害と、細胞内取込の阻害に依存しない cimetidine による尿細管障害軽減を検出できることが明らかとなった。この結果は、腎毒性が、cisplatin の

ように過酸化脂質や、フリーラジカルが原因と考えられるような薬物に関して、Tg マウスが尿細管の毒性を評価することができる有用なツールであることを示唆する。

Cisplatin 投与マウスにおいて、cimetidine 処理によって尿中 hL-FABP 排泄は無処理マウスと比較して有意に減少したが、BUN や血漿中クレアチニンにおいて cimetidine の影響は観察されなかった。この結果より、cimetidine は、近位尿細管において、cisplatin による細胞毒性を持つ過酸化脂質生成を抑制したと考えられる。鉄の触媒作用によって産生される活性酸素は、cisplatin による腎毒性の重要な因子であると考えられている。Cisplatin は、腎臓内の P-450 の量を減少させ、その結果、触媒作用活性を有する鉄の含量を上昇させる。Cimetidine は、腎臓における P-450 の含量の減少を抑制し、触媒作用活性を有する鉄の産生を抑えることで、cisplatin による腎毒性を軽減することが報告されている。Cimetidine は、この鉄の含量の上昇を抑制する働きがある。鉄等の遷移金属は、活性酸素との相互作用により過酸化脂質生成を促進することが知られている。Cimetidine は、この一連の反応において重要な役割を果たす鉄の産生を抑制することで、活性酸素の産生を防いだと考えられ、その結果、脂質ラジカルの産生が抑えられることで細胞毒性活性を持つ脂質が減少し、cisplatin によって上昇した尿中 hL-FABP 排泄を減少させたと考えられる。Cimetidine は尿細管のみでこの役割を果たしたため、hL-FABP は減少させた一方、BUN や血漿中 creatinine には影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。

以上より、ヒト L-FABP トランスジェニックマウスを用いることにより、臨床データのメカニズム解析を進めることが可能になると考えられ、シスプラチンや COX-2 阻害薬などの薬剤性腎障害モデルに関しても報告され始めたことから、新薬開発や薬剤相互作用の解析の面からも、今後の利用が期待される。

## 学位論文審査結果の要旨

近位尿細管の虚血などによる腎毒性の結果生じる遊離脂肪酸負荷の増大に応答して、L型脂肪酸結合蛋白(L type fatty acid binding protein; L-FABP)をコードする遺伝子の発現が誘導され、細胞内L-FABPが細胞外へ排出される。このことから、尿中に排泄されたL-FABP蛋白が尿細管上皮細胞の損傷のバイオマーカーになると期待されているが、それを実証する動物モデルがなかった。

そこで本研究において、その動物モデルを作成し、以下に示す新規な結果を得た。

(1) マウス腎臓においてはL-FABPが発現していないことから、ヒトhL-FABPの遺伝子転写調節領域を含む遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを作製することに成功し、このマウスの腎虚血によってhL-FABP遺伝子の発現誘導と、それに引き続いて起こる酸化ストレスの上昇に伴い、速やかにhL-FABP蛋白が尿中に排泄されることを明らかとした。

(2) 抗腫瘍薬 cisplatin を投与した Tg マウスにおいて尿中 hL-FABP 排泄が著しく上昇したが、cimetidine 処理によって無処理マウスと比較して尿中 hL-FABP は有意に減少した。糸球体損傷のマーカーである BUN や血漿中クレアチニンには cimetidine の影響が観察されなかったことから、尿中 hL-FABP は cisplatin による尿細管上皮細胞の損傷のバイオマーカーとなることが確認された。Cimetidine は、cisplatin の血漿中濃度推移や腎臓-血漿中濃度比に影響を及ぼさず、腎スライスを用いた cisplatin の取り込みにおいても、阻害効果を示さなかったことから、cimetidine による腎毒性軽減の機構は、従来より推定されていたトランスポーターを介した取り込み阻害による上皮細胞内蓄積低下とは異なることが示唆された。

以上の結果より、Tg マウスにおける尿中 hL-FABP は、尿細管上皮細胞の虚血および薬物による損傷のバイオマーカーとなること、薬物併用による腎毒性軽減を検出できることが明らかとなった。本研究によって開発した Tg マウスは、近位尿細管において過酸化脂質やフリーラジカルを産生する薬物による腎毒性の評価系として有用と思われ、副作用の少ない医薬品の開発に貢献することが期待されることから、博士(薬学)にふさわしいと判定した。