

造影剤腎症の発現機序解明による予防薬の探索研究

千堂年昭^{a,b}^a岡山大学病院 薬剤部, ^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床薬剤学

キーワード: 造影剤腎症, アポトーシス, サイクリック AMP, ベラプロスト

Experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast medium

Toshiaki Sendo^{a,b}^aDepartment of Pharmacy, Okayama University Hospital.^bDepartment of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

X線造影技術は近年目覚ましい発展を遂げ、それに伴い造影剤の使用は増加の一途を辿っている。ヨード造影剤はX線の吸収を高める優れた陽性造影剤であるが、注入直後に紅斑や蕁麻疹などの過敏症状が発現することがあり、時として呼吸困難、肺水腫、意識消失、心停止といった重篤なショック症状を引き起こすこともある。また、投与数日以内に紅斑や発疹、悪心などの遅発型過敏反応を引き起こすことがある。一方、造影剤は、造影剤腎症と呼ばれる急性の腎障害を引き起こすことが知られている。造影剤腎症は患者のQOLを低下するだけでなく、入院延長に伴う医療費増大という医療経済面でも重大な問題となる。特に、糖尿病などにより腎機能が低下している患者や、抗腫瘍薬や抗菌薬、解熱鎮痛薬などを使用している患者、または高齢者などにおいては、その発症頻度は10~30%と非

常に高く、代表的な薬剤性腎症の一つとなっている。造影剤腎症の発症機序に関しての詳細は不明であるが、造影剤の投与によって腎血管が収縮し、腎血流量や糸球体濾過量が低下するため、血管性の要因が考えられている。さらに、造影剤は尿細管細胞に対して直接的な細胞毒性を示すことも知られている。造影剤腎症の予防薬としての有効性を調べる目的で、これまでに数多くの薬剤について臨床試験が実施されてきたが、残念ながら、臨床での有用性が証明されたものはほとんどなく、唯一認められている予防法は大量の輸液による腎臓からの排泄促進である。

本稿では、培養腎尿細管細胞を用いて、造影剤腎症の発症にいたる細胞内シグナル伝達経路の解明に基づいた予防薬探索について概説する。

造影剤による腎細胞アポトーシス誘導とカスパーゼの役割¹⁾

ブタ近位尿細管由来細胞(LLC-PK1細胞)を100mgヨード/mlの濃度の造影剤曝露により、アポトーシス初期の指標であるホスファチジルセリンを特異的に染色するAnnexin V染色や、障害された核を染色する

平成21年5月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7640 FAX: 086-235-7794

E-mail: sendou@md.okayama-u.ac.jp

◆ プロフィール ◆



1985年 九州大学大学院薬学研究科博士課程修了
 1985年-1987年 米国カンザス大学薬学部博士研究員
 1987年 九州大学病院薬剤部薬剤師
 2003年 九州大学病院薬剤部 副薬剤部長
 2005年 岡山大学病院 准教授・副薬剤部長
 2008年 岡山県病院薬剤師会会長
 2009年 岡山大学病院 教授・薬剤部長 治験センター長

専門領域: 臨床薬理学, 臨床薬剤学, 医薬品情報解析学
 研究テーマ: 医薬品の有害作用発現機序の解明と予防策に関する研究
 (とくに造影剤, 抗がん薬, 脂質低下剤, 免疫抑制薬)
 医薬品の有害事象発症リスクの解析に関する研究
 薬物代謝酵素の遺伝子型判定と薬物治療の個別化
 快・不快状況時の神経細胞情報伝達経路の解明

TUNEL 染色において陽性を示す細胞が顕著に増加したことから、DNA の断片化が認められたことから、この細胞障害はアポトーシスによるものと考えられる。また、造影剤（本研究では非イオン性造影剤、イオベルソールを使用）による DNA 断片化は、非特異的なカスパーゼ阻害剤、カスパーゼ 3 阻害剤およびカスパーゼ 9 阻害剤の前処置によって消失したが、カスパーゼ 8 阻害剤では影響されない。この結果と一致して、造影剤曝露により細胞内カスパーゼ 3 および 9 の活性が顕著に亢進していた（図 1）。さらに、造影剤曝露によりアポトーシス抑制因子である bcl-2 mRNA 発現の低下およびアポトーシス促進因子である bax mRNA 発現の増加が観察された（図 2）。したがって、造影剤は腎尿管細胞に直接作用し、Bcl-2 の発現量を低下し、Bax 発現量を増加することによって、カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 を活性化し、アポトーシスを引き起こすと考えられた。

ヨード造影剤によるカスパーゼ活性化に対する cAMP の保護作用^{2,3)}

Bcl-2 遺伝子には cAMP-responsive element (CRE) と呼ばれる転写調節領域が存在し、この部位に CRE 結合タンパク (CREB) が結合すると bcl-2 発現量が増加することが知られている。CREB は通常、細胞質に存在し、リン酸化されることで核内に移行し CRE に結合する。この CREB のリン酸化に参与する細胞内シグナルの一つに cAMP/A キナーゼ系がある。そこで、

細胞内 cAMP を増加させることにより造影剤によるアポトーシスが抑制されるであろうと考え、造影剤誘発細胞障害に対する非加水分解性 cAMP アナログのジブチリル cAMP (DBcAMP) や PGI₂ アナログのベラプロストの作用について検討した。その結果、い

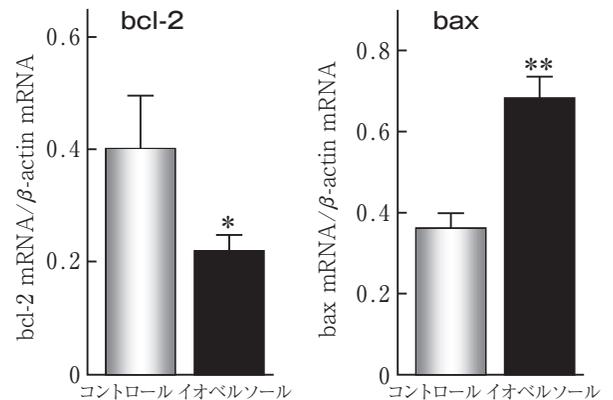
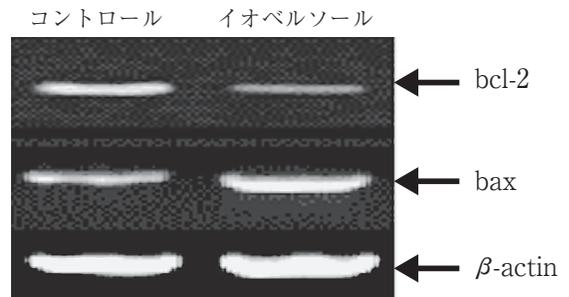
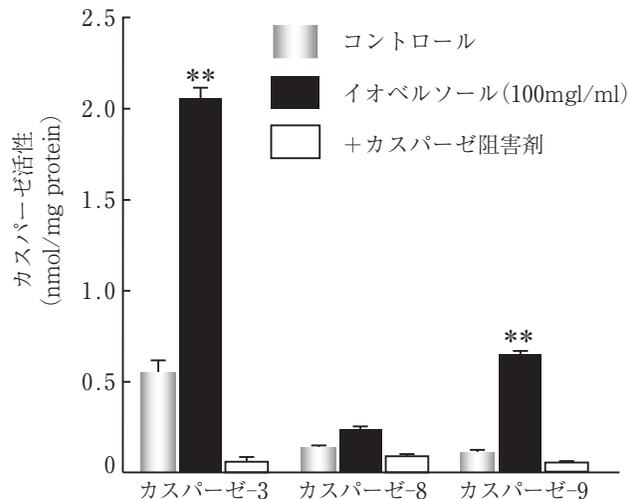


図 2 LLC-PK 1 細胞におけるイオベルソール誘発 bcl-2 mRNA 発現低下作用ならびに Bax mRNA 発現増加作用 (*p<0.05, **p<0.01) (文献 1 より引用)



- 1 : コントロール
- 2 : イオベルソール 100mg/ml
- 3 : +非特異的カスパーゼ阻害剤 (30μM)
- 4 : +カスパーゼ 3 阻害剤 (50μM)
- 5 : +カスパーゼ 8 阻害剤 (50μM)
- 6 : +カスパーゼ 9 阻害剤 (50μM)

図 1 イオベルソールによる DNA 断片化およびカスパーゼ-3 ならびにカスパーゼ-9 活性化 (**p<0.01) (文献 1 より引用)



れも、造影剤による尿細管細胞障害を保護するとともに、造影剤による bcl-2 mRNA 発現低下、カスパーゼ 9 およびカスパーゼ 3 の活性化を抑制することが明らかとなった (図 3)。さらに、DBcAMP やベラプロストにより尿細管細胞において顕著な CREB リン酸化が認められた。また、ベラプロストによる細胞保護作用と細胞内 cAMP 濃度の上昇とは濃度的によく一致していたことから (図 4)、尿細管における cAMP/プロテインキナーゼ A/CREB 系の活性化が造影剤腎症の予防に有効であろうと考えられた。

一方、プロテインキナーゼ A から CREB リン酸化に

至る経路にホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/Akt の経路が関与すること、造影剤が Akt のリン酸化を抑制することも明らかになった。また、cAMP による保護作用における CREB リン酸化の関与を明確にするために、不活性化 CREB を導入した細胞を用いて検討した結果、造影剤に対する DBcAMP の保護作用は細胞生存率のみならず bcl-2, bax mRNA 発現変化においても完全に消去された (図 5)。したがって、造影剤は Akt リン酸化を抑制することにより、CREB リン酸化抑制→bcl-2 発現低下→bax 発現増加→カスパーゼ活性化→核障害の経路によりアポトーシ

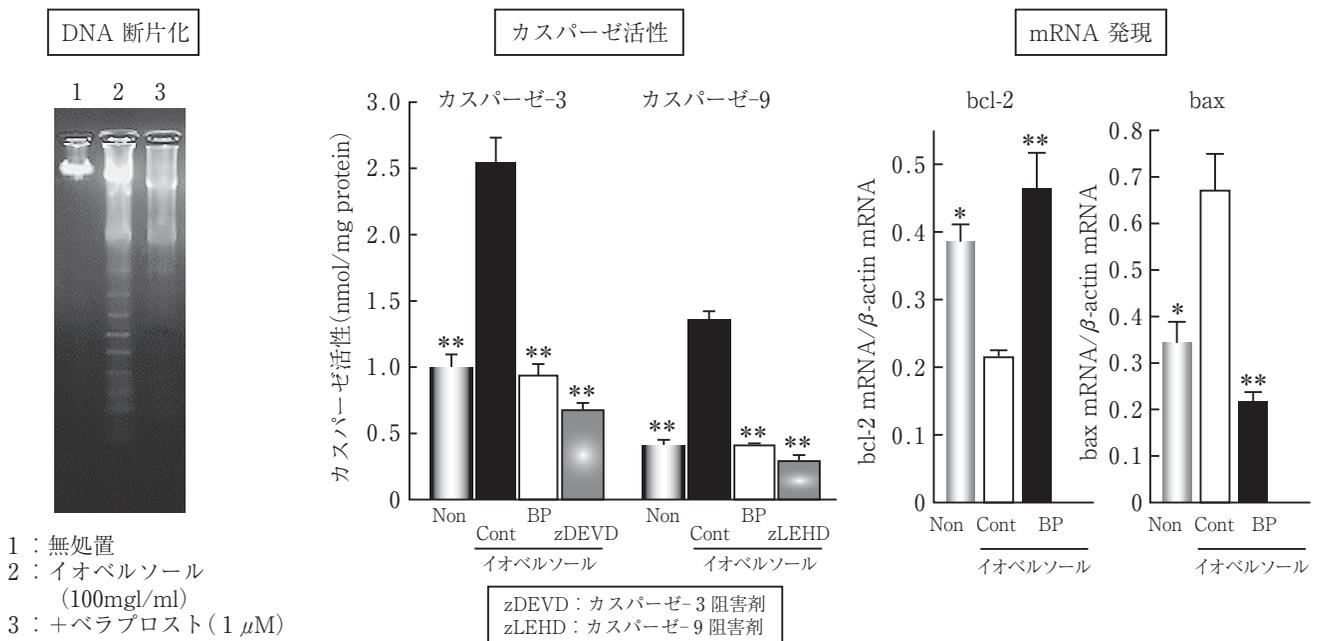


図 3 イオベルソール誘発 LLC-PK 1 細胞障害に対するベラプロスト (BP) の保護作用 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (文献 2 より引用)

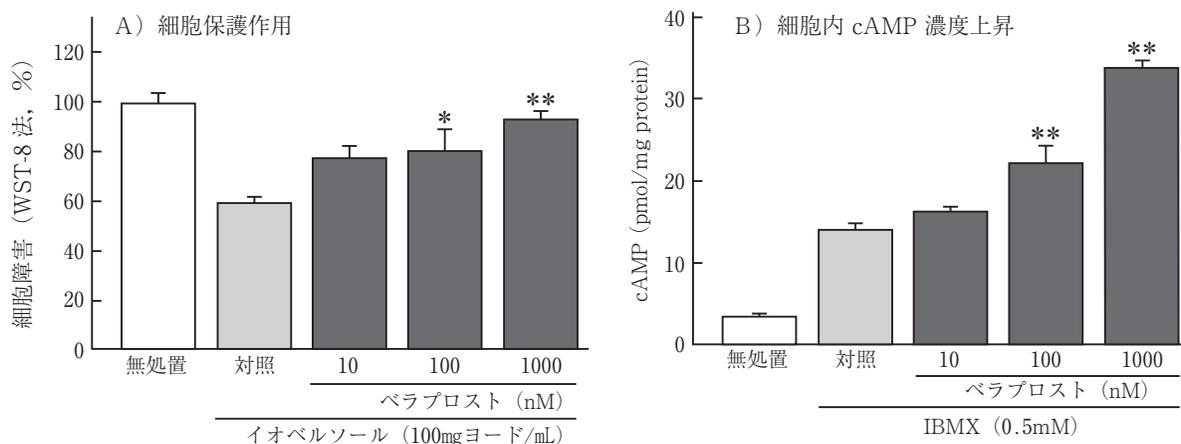


図 4 イオベルソールによる LLC-PK 1 細胞障害に対するベラプロストの保護作用 (A) ならびにベラプロストによる細胞内 cAMP 濃度増加作用 (B) (文献 2 より引用)

スを引き起こすと考えられた (図6)。

造影剤腎症マウスにおけるベラプロストの保護作用⁴⁾

In vitro 実験 (培養細胞) 系で得られた結果が, *in vivo* (動物) においてもあてはまることを確認するため, マウスを用いて造影剤腎症モデルを作成し, ベラプロストによる保護作用について検討した. 片腎を結紮したマウスに造影剤 (4 g ヨード/kg) を静脈内投与すると, 24時間後には尿中 NAG 活性が顕著に増加した. 一方, 腎組織を TUNEL 染色したところ, 尿細管

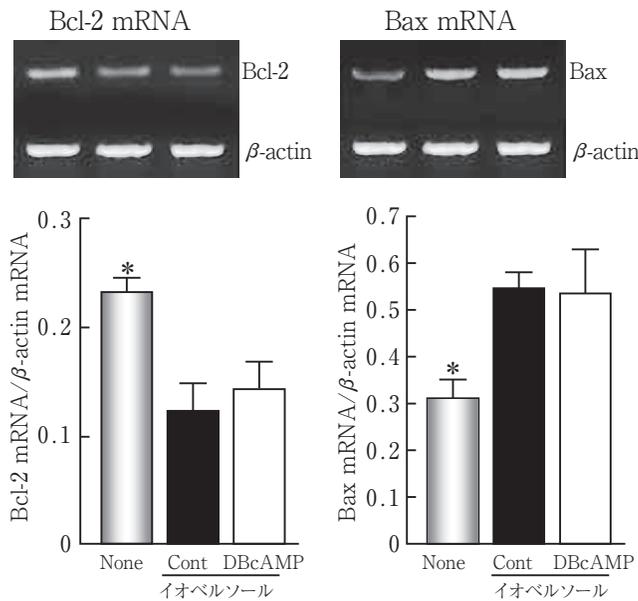


図5 イオベルソール誘発 Bcl-2 および Bax mRNA 発現変化に対する DBcAMP の作用, Dominant-negative CREB 移入細胞での検討 (文献3より引用)

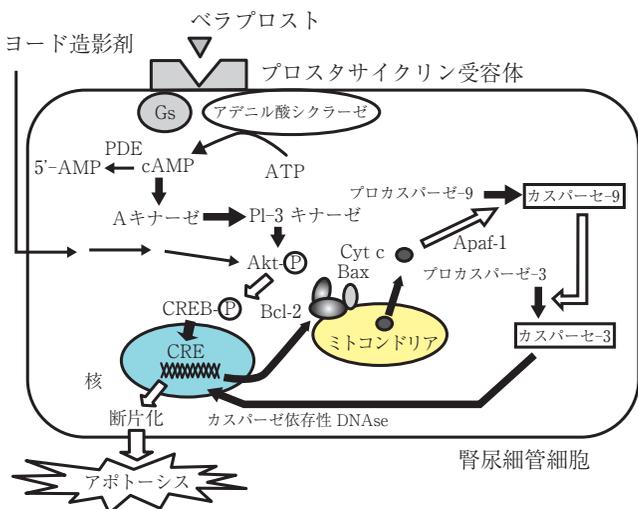


図6 造影剤腎症の発症機序ならびにベラプロストによる保護作用機序

細胞にアポトーシスが生じていることが確認された (図7). さらに, 造影剤を投与したマウスの腎組織では, カスパーゼ-3 活性が顕著に増加しており, また, bcl-2 mRNA の低下ならびに bax mRNA の増加が認められた. これらの変化はいずれもベラプロスト (0.1 ~ 0.3mg/kg) の腹腔内投与により用量依存的に抑制され, 特に0.3mg/kgの用量では抑制作用はほぼ完全であった (図8). ベラプロストはプロスタサイクリン受容体 (IP 受容体) を刺激するが, この受容体はGタンパク質共役型受容体であり, 促進性Gタンパク (Gs) を

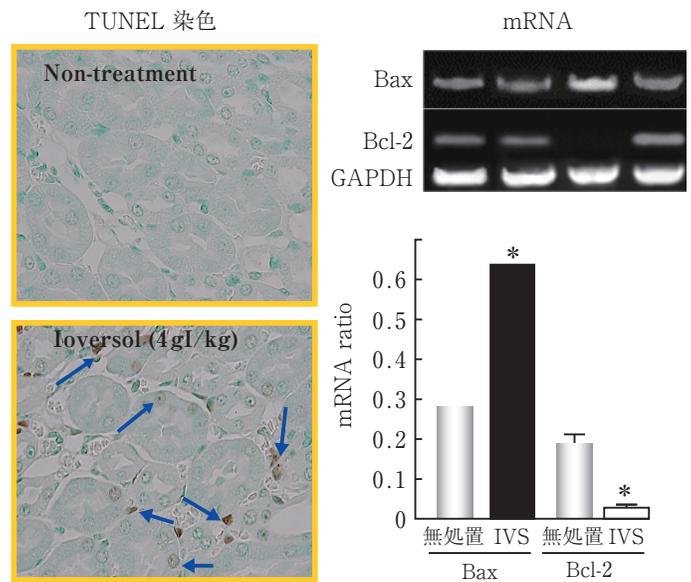


図7 造影剤腎症モデルマウスの腎における障害と機序 (文献3より引用)

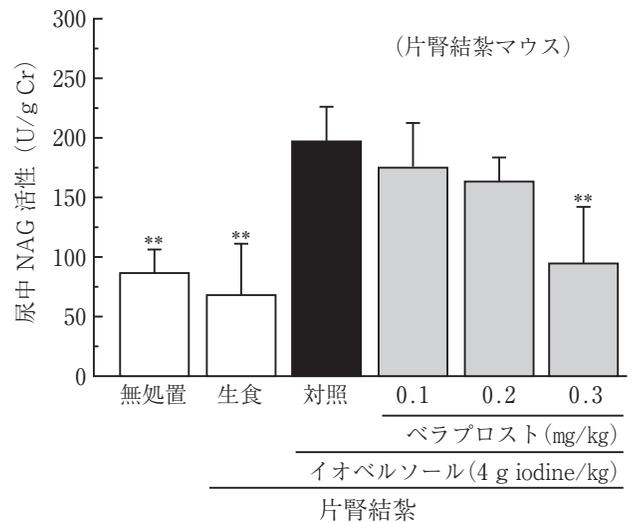


図8 造影剤腎症モデルマウスにおけるベラプロストの保護作用, 尿中 NAG 排泄増加に対する抑制作用 (**p<0.01) (文献2より引用)

介して cAMP 産生を促進する。ヒトの腎臓には IP 受容体が多く存在し、特に糸球体、血管内皮細胞、遠位尿細管、集合管に多い。ベラプロストは慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛及び冷感の改善、原発性肺高血圧症に保険適用を有する医薬品であり、まれに頭痛、顔面潮紅、ほてり等の副作用が出ることもあるが、重篤な副作用はほとんどないことより臨床応用が期待される。

おわりに

造影剤による腎障害の発現機序を明らかにするとともに、発現機序に基づく予防薬の提案ならびにその効果を示した。ベラプロストは腎に多く分布する PGI₂ レセプターを刺激し、細胞内 cAMP 産生を高めることにより、造影剤腎症に対する有効な予防薬になりうるものと考えられる。

文 献

- 1) Yano T, Itoh Y, Sendo T, Kubota T, Oishi R: Cyclic AMP reverses radiocontrast media-induced apoptosis in LLC-PK1 cells by activating A -kinase/PI3 kinase. *Kidney Int* (2003) 64, 2052-2063.
- 2) Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Oishi R: A prostacyclin analog beraprost sodium attenuates radiocontrast media-induced LLC-PK1 cells injury. *Kidney Int* (2004) 65, 1654-1663.
- 3) Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Koyama T, Fujita T, Saeki K, You A, Oishi R: A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein. *Am J Pathol* (2005) 166, 1333-1342.
- 4) Itoh Y, Yano T, Sendo T, Sueyasu M, Hirano K, Kanaide H, Oishi R: Involvement of de novo ceramide synthesis in radiocontrast-induced renal tubular cell injury. *Kidney Int* (2006) 69, 288-297.