

シスプラチン投与に伴う 腎障害を予測する高感度バイオマーカーの開発

申請者： 名古屋市立大学大学院
薬学研究科 講師 堀田祐志

共同研究者： 藤田医科大学
講師 前田康博
名古屋市立大学病院薬剤部
主査 近藤勝弘
名古屋市立大学大学院医学研究科
教授 木村和哲

1. 研究の背景・目的

シスプラチン (CDDP) は様々な悪性腫瘍に用いられる抗がん剤である。CDDP の重篤な副作用として急性腎障害 (AKI) を引き起こすことは良く知られている。予防策として輸液の投与が行われているが、十分に発症を防ぐことはできていないのが現状である。AKI は一過性に腎機能マーカーBUN や SCr が上昇する。その後、通常では腎機能マーカーは元の値まで戻るが、一部の AKI 発症患者では腎機能が戻らず慢性腎臓病 (CKD) へと移行してしまう。¹ 現在使用されている腎機能マーカーの BUN や SCr は腎機能が 50%ほど低下しなければ、上昇が見られないため軽度の腎障害は反映されない。² つまり、AKI によって軽度な腎機能低下が残っていても BUN や SCr では反映されず、CDDP の繰り返し投与が行われることにより CKD に移行してしまう可能性がある。AKI や CKD への進行を予測することは既存の腎機能マーカーでは困難であるため、軽度な腎機能障害も反映できる高感度なバイオマーカーの開発が望まれる。

これまでの我々の研究から、対称性ジメチルアルギニン (SDMA) が、BUN や SCr では反映できない、CDDP 単回投与時の軽度の腎障害を反映することを明らかにした。つまり、SDMA は AKI の発症や、残腎機能を予測し、CKD への進行を予防するための有用なバイオマーカーとなりうるかもしれないことが示唆された。^{3,4} しかし、SDMA が上昇するメカニズムや

実臨床での有用性は明らかとなっておらず、さらなる検討が必要である。

そこで本研究では、1. CDDP 投与後の SDMA 上昇メカニズムの解明と 2. CDDP 投与患者における SDMA を測定することで実臨床での有用性を検討することとした。

2. 研究の対象ならびに方法

2-1. CDDP 投与後の SDMA 上昇メカニズムの解明

CDDP 1 mg/kg もしくは vehicle を腹腔内投与し 5 日後に採取したラット (control 群、CDDP 1 mg/kg 群) の腎組織を用いて各種トランスポーター(cationic amino-acid transporter [CAT]、organic anion transporter 1[OAT1]、organic cation transporter 2 [OCT2]、copper transporter [Ctr1]、multidrug and toxin extrusion protein 1 [MATE1]) の mRNA 発現量を real time PCR を用いて検討した。また、SDMA の産生酵素である protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)、methylosome protein (MEP50) の mRNA 発現量についても同様に検討した。

2-2. CDDP 反復投与時の CKD 移行性における SDMA 測定の有用性に関する検討

CDDP は臨床において複数サイクル施用される。そのため CDDP 反復投与時で検討が必要となる CDDP 1 mg/kg 反復投与 (i. p.) を行った。1 サイクルを 7 日として 4 サイクル行った。1 サイクルごとにおける day 0, day 5 の尿、血清を採取した。尿・血液を用いて SCre, BUN は富士フィルムモノリスに委託し、SDMA は本学薬学の UPLC-MS/MS を用いて測定を行った。⁵ CKD 移行時における SDMA の有用性を検討した。最終サイクル後は腎組織も摘出し、組織学的検討を行った。

2-3. CDDP 投与患者における腎機能評価における SDMA 測定の有用性の検討

2-3-1. 対象患者

名古屋市立大学病院にて CDDP を含む化学療法を施行する 20 歳以上の入院患者を対象とし同意取得後、本研究へリクルートした。

2-3-2. 研究方法

同意が得られた対象患者に 1 サイクル目から最大 3 サイクル目まで day 0~day 7 まで毎日採尿を行った。患者背景として、体重、年齢、性別、腎機能 (SCre, BUN) を電子カルテから抽出した。血清、尿サンプルは UPLC-MS/MS を用いて、現在 SDMA 濃度を測定している。

3. 研究結果

3-1. CDDP 投与後の SDMA 上昇メカニズムの解明

腎組織中 CAT mRNA の発現の検討を試みたが、腎組織中の mRNA 発現量が少なかったため、real-time PCR 法での CAT mRNA の発現量の差を明らかにすることはできなかった。メチルアルギニンの取り込みに関与する OAT1 mRNA 発現量について調べたところ、CDDP の投与による変化は認められなかった。近位尿細管において CDDP の取り込みをおこなう OCT2、Ctr1、排泄に関与する MATE1 についても検討を行ったが、OCT2、Ctr1、MATE1 はいずれも投与による発現量の変化は見られなかった。⁶ そこで、次に SDMA の産生に関与する PRMT5 と MEP50 の mRNA 発現量を検討した。⁷ CDDP 1 mg/kg 群では control 群と比較して PRMT5 と MEP mRNA の発現量は低下が見られた。

3-2. CDDP 反復投与時の CKD 移行性における SDMA 測定の有用性に関する検討

これまでの研究で CDDP 1 mg/kg の単回投与による尿中 SDMA の上昇や腎障害、また腎における各種トランスポーターの発現低下が認められた。そこで、CDDP を繰り返し投与した場合での尿中の SDMA 推移を検討し、CKD の発症を予測できるバイオマーカーとなりうるか、検討することとした。

CDDP 1 mg/kg の反復投与では、BUN、SCre の上昇は、初回、反復投与時のいずれにおいても認められず、control 群と比較して差は見られなかった。一方、尿中 SDMA は初回 CDDP 投与によって上昇し、その後は control 群と比較して高値を示した。反復投与によるさらなる尿中 SDMA 値の上昇は認められなかった。4 サイクルの CDDP 投与後の腎組織の組織学的評価を行ったところ異形再生上皮が観察され、CDDP の反復投与による腎障害が確認された。

3-3. CDDP 投与患者における腎機能評価における SDMA 測定の有用性の検討

最大 3 サイクルの CDDP を用いた治療を行った入院患者、10 名から同意が得られた。電子カルテから腎機能マーカー、SCre の day 0 から day 7 までの推移を検討したが、サイクル数による腎機能の低下や AKI の発症が認められた患者は 0 名であった。患者の尿サンプルは day 0 から day 7 まで採取した。尿サンプル、血清サンプル中の SDMA 濃度は、現在 UPLC-MS/MS を用いた解析を引き続き行っている。

4. 考察

これまでの検討では CDDP 単回投与によって尿中 SDMA の上昇や組織学的評価により、軽

微な腎障害が認められた。今回、近位尿細管における CDDP の取り込み、排泄トランスポーターの mRNA 発現量を検討したが、control と比較して発現量に差は認められなかった。このことから、CDDP 1 mg/kg 投与は CDDP の取り込み、排泄トランスポーターの mRNA 発現量には影響を与えない軽微な腎障害であることが示唆された。一方、尿中 SDMA 排泄量は増加したが、腎組織中の SDMA 産生酵素の mRNA 発現量は低下した。SDMA の体内での増加による代償的な機構により mRNA 発現量が減少したものと推察される。SDMA は腎だけではなく全身で産生されるため、全身での産生が上昇、もしくは SDMA の再吸収を担う取り込みトランスポーターの発現が低下し、再吸収が減少した結果、尿中 SDMA が増加したのかもしれない。今回 SDMA の輸送に関与する CAT の発現量は検討ができなかった。今後、近位尿細管に存在する他のトランスポーターについても検討する必要がある。

次に我々は、実臨床を見据えて CDDP の反復投与時の SDMA レベルの変化を検討した。CDDP を反復投与したラットでは、どの時点においても BUN や SCr の上昇は認められなかったが、SDMA は高値を示し、4 サイクル終了時では腎組織に異形再生上皮も認められた。このことから、尿中 SDMA の増加は CDDP の単回投与や反復投与における腎の軽微な障害の残存を示唆しているかもしれない。投与量の増加、またはサイクル数を増加させた場合、AKI から CKD の移行時の SDMA の推移を検討し、CKD への移行を予測することができるか、さらなる検討を行う必要がある。

患者検体では、AKI を発症した患者はいなかった。SDMA の推移は現在解析中であるが、SDMA の推移を検討することで、SCr の上昇が認められなくても軽微な腎障害を反映する可能性があり、CDDP の投与を繰り返した場合の AKI 発症、CKD の予測ができるかもしれない。軽微な腎障害を反映する高感度マーカーである可能性があり、今後も実臨床での検討を行う必要がある。

5. 文献

1. Latcha S, Jaimes EA, Patil S, Glezerman IG, Mehta S, Flombaum CD. Long-Term Renal Outcomes after Cisplatin Treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* **11**(7):1173-9. 2016.
2. Malhotra R, Siew ED. Biomarkers for the Early Detection and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* **12**(1):149-173. 2017.
3. El-Sadek AE, Behery EG, Azab AA, Kamal NM, Salama MA, Abdulghany WE, Abdallah EA. Arginine dimethylation products in pediatric patients with chronic kidney disease. *Ann Med Surg (Lond).* **9**:22-7. 2016.
4. Betz B, Möller-Ehrlich K, Kress T, Kniepert J, Schwedhelm E, Böger RH, Wanner

- C, Sauvant C, Schneider R. Increased symmetrical dimethylarginine in ischemic acute kidney injury as a causative factor of renal L-arginine deficiency. *Transl Res.* **162**(2):67-76. 2013.
5. Servillo L, Giovane A, D'Onofrio N, Casale R, Cautela D, Castaldo D, Balestrieri ML. Determination of homoarginine, arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in biological samples by HPLC-ESI-mass spectrometry. *Int J Mol Sci.* **14**(10):20131-8. 2013.
 6. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res.* **34**(1):547-50. 2014.
 7. Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, Fukamizu A. Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem.* **161**(6):521-27. 2017.
6. 学会発表
1. Hotta Y, Naiki-Itoh , Kitagawa A, Tomita N, Kondo M, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. Urinary symmetric dimethylarginine reflects mild renal damage after cisplatin treatment in rats. *American Society of Nephrology, Kidney Week 2018*. (San Diego USA) Oct.23-28. 2018.