

アルギニン類似物に着目した シスプラチン投与に伴う腎障害の予測

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

近年、抗がん剤化学療法に伴う腎障害が注目されている。抗がん剤であるシスプラチン (CDDP) 投与に伴う腎障害は特に広く知られており、多くの予防策や打開策が検討されてきた。一般に輸液による予防策が講じられているが、急性腎障害の発症はあとを絶たない。また、がん化学療法では、投与が複数回繰り返されることも少なくなく、慢性腎臓病 (CKD) への移行も懸念される。汎用されている、SCr や BUN では軽度の腎障害が反映されないといわれており、早期かつ、軽度の腎障害を反映できるバイオマーカーの開発が期待される。

我々はこれまでにアルギニン類似物である、対称性ジメチルアルギニン (SDMA) が CDDP 投与による SCr や BUN では反映できない軽度腎障害を反映することを明らかにした。さらに、SDMA 合成に関与する、タンパク質アルギニンメチル化酵素 (PRMT) の発現量に変動がみられることも明らかにした。PRMT は SDMA だけでなく、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の合成にも関与することが分かっている。しかし、SDMA は分解されない一方、ADMA は腎組織内の分解酵素ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドラーゼ (DDAH) によって分解される。このような代謝の違いから SDMA と ADMA の両者を測定することにより、より詳細な腎障害の検討を行うことができ、CDDP 投与による AKI 発症リスクの高い患者や、腎障

害患者を高感度にスクリーニングできるのではないかと考えられる。そこで、本研究では前年度に引き続き、動物モデル、ヒト検体を用いて SDMA、ADMA レベルと CDDP 投与に伴う腎障害発症、CKD への移行性について検討を行うことを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

2-1. CDDP 投与によるアルギニン類似物質の推移の検討 —動物実験—

2-1-1. CDDP 単回投与時のアルギニン類似物質の推移

CDDP 1 mg/kg を腹腔内投与し、動物モデルを作成した。コントロール群には生理食塩水を同量投与した。day 0、day 5 で尿、血清を採取する。SCr、BUN、尿中アルブミンレベルを評価した。また、ADMA、SDMA 濃度を、超高速クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計 (UPLC-MS/MS) を用いて解析した。また、腎組織を day 5 に採取し、HE 染色による観察を行った。

2-1-2. CDDP 反復投与時の CKD 移行性におけるアルギニン類似物質測定の有用性

CDDP 1 mg/kg 反復投与 (i. p.) を行った。コントロールは生理食塩水を投与した。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 day0, day5 の尿、血清を採取し、UPLC-MS/MS を用いて ADMA、SDMA 濃度を測定した。

2-2. CDDP 投与によるアルギニン類似物質の合成、分解酵素への影響 —細胞実験—

CDDP では特に腎近位尿細管細胞に障害が出るといわれている。ヒト尿細管細胞 (HK-2) 細胞を用いて、CDDP 添加による毒性の評価を行った。また、CDDP 添加後の細胞を回収し、合成、分解酵素の発現量の変動を評価した。

2-3. CDDP 投与患者における腎機能評価におけるアルギニン類似物質測定の有用性

1-3-1. 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。

1-3-2. 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 day0-day7 まで毎日採尿を行った。血清は投与前と、投与後 7 日以内に採取した。患者背景として、体重、年齢、性別、腎機能 (SCr, 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、SDNA、ADMA 濃度を測定した。

3. 研究結果

3-1. CDDP 単回投与後の ADMA、SDMA の推移

CDDP1 mg/kg投与後、血中 ADMA、SDMA 濃度はコントロール群と比較して変化が見られなかった (data not shown)。既存のマーカーである、SCr、BUN、尿中アルブミン/クレアチニン比 (UAC) も上昇は見られなかった (Table 1)。尿中 SDMA は CDDP 投与によって上昇がみられた一方、尿中 ADMA は上昇せず、コントロール群と同程

Table 1 CDDP 投与 5 日目の SCr、BUN、尿中アルブミン/クレアチニン比

	Control	CDDP 1mg/kg	<i>p</i>
SCr (mg/dL)	0.22±0.017	0.26±0.016	n.s.
BUN (mg/dL)	17.0±0.82	14.3±0.49	n.s.
UAC	n.d.	n.d.	—

n. s.; not significant, n. d.; not detected

Table 2. CDDP 投与 5 日目の尿中 ADMA、SDMA 総排泄量

	Control	CDDP 1mg/kg	<i>p</i>
ADMA(μg)	5.20±0.31	5.43±1.23	n.s.
SDMA(μg)	76.40±13.68	286.91±65.13	n.s. < 0.01

度であった (Table 2)。HE 染色により、腎組織を観察したところ、CDDP1 mg/kg群で腎障害が認められた。

3-2. CDDP 反復投与時の ADMA、SDMA の推移

CDDP1 mg/kg反復投与において SCr、BUN の上昇は、初回、反復投与後においても認められなかった。尿中 SDMA は初回投与後に上昇し、以後観察期間中は上昇が続いた。反復投与によるさらなる上昇は認められなかった。尿中 ADMA は初回、反復ともに上昇は見られなかった。腎組織を観察したところ、反復投与後では異形上皮再生像が認められた。

3-3. 尿細管細胞における CDDP 毒性発現と合成、分解タンパクの発現変動

0 から 100 μM までの CDDP 溶液を作成し、細胞に添加、毒性評価を行ったところ、25 μM で細胞生存率 50%まで低下した。その細胞を回収し、現在産生酵素、分解酵素の発現を検討中である。

3-4. CDDP 投与患者における腎機能評価における ADMA、SDMA 測定の有用性の検討

CDDP を用いた化学療法を施行する 11 名から同意が得られ、血液、尿を採取した。電子カルテから腎機能マーカー、SCr の day0 から day7 までの推移を各サイクルで検討したが、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。尿サンプル、血清サンプル中の ADMA、SDMA を測定したが、CDDP 投与後において濃度変化に一定の傾向は見られなかった。また、2、3 サイクル目の ADMA、SDMA 濃度に関しても、初回と比較して顕著な変動は見られなかった。

4. 考察

前年度までの検討により、尿中 SDMA が CDDP 投与による AKI を反映する高感度なマーカーであることが示されていた。今年度の検討では、類似物質である ADMA を合わせて測定することで、より詳細に腎障害が反映できるのではないかと考え、検討を行った。CDDP 単回投与において、既存腎障害マーカーである、SCr、BUN が上昇していないにも関わらず、尿中 SDMA は上昇がみられた。また腎組織から、CDDP 単回投与によって軽微な腎障害がみられており、尿中 SDMA は SCr、BUN で反映できない軽微な腎障害を反映したことが示唆された。また、尿中アルブミン/クレアチニン比の上昇も見られなかったことから、尿中 SDMA は尿中アルブミンよりも高感度なマーカーであると考えられる。一方、尿中 ADMA は上昇しなかった。このことは ADMA が体内で分解されることによるものであると推測される。腎細胞への CDDP の投与による産生、代謝酵素発現を検討することで、SDMA と ADMA の変動についての違いをより詳細に明らかにできる。

がん化学療法では複数回の投与が行われることが多く、CKD への移行へつながることもある。そのため、CDDP の反復投与に伴う尿中 SDMA、ADMA の推移を検討し、CKD への移行が予測できるか検討を行った。尿中 SDMA は初回投与で上昇がみられた後、上昇は維持されており、反復投与による変化は見られなかった。また尿中 ADMA は反復投与を行っても上昇は見られなかった。AKI は SCr や BUN の値がもとに戻ることから、化学療法は継続される。しかしながら、腎組織では SCr や BUN では反映できない障害や異常な再生がおきており、尿中 SDMA は軽微な腎障害とともに、残存している組織障害を示唆しているものと考えられる。尿中 ADMA は代謝されるため、軽微な腎障害では ADMA の産生が増加しても尿中では増加がみられなかったのかもしれない。ADMA の代謝酵素は腎臓に発現することがわかっているため、腎障害の程度によって、尿中 ADMA も変化がみられる可能性がある。今回の反復投与では SCr や BUN の上昇はみられていないことから、CKD への移行を正確に検討できていないと考えられる。CDDP 投与量を増やして更なる検討を行う必要がある。

ヒト検体を用いた検討では AKI の該当患者がおらず、また尿中、血中 ADMA、SDMA レベルもバラつきが大きく、一貫性のあるデータは得られなかった。臨床では腎組織の病理的診断が困難であること、また AKI の判定も SCr によるものであるため、どの程度の SDMA、ADMA の上昇が腎障害を表しているか不明である。AKI 発症患者の例を収集し、前後の SDMA、ADMA レベルを検討することで、実臨床において AKI を予測できるマーカーとなりうるか検討する必要がある。

5. 文献

1. Malhotra R, et al. Biomarkers for the Early Detection and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Jan 6;12(1):149-173.
2. Latcha S, et al. Long-Term Renal Outcomes after Cisplatin Treatment. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Jul 7;11(7):1173-9.
3. El-Sadek AE, et al. Arginine dimethylation products in pediatric patients with chronic kidney disease. *Ann Med Surg (Lond)*. 2016 Jun 2;9:22-7.
4. Betz B, et al. Increased symmetrical dimethylarginine in ischemic acute kidney injury as a causative factor of renal L-arginine deficiency. *Transl Res*. 2013 Aug;162(2):67-76.
5. Hirota K, et al. Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem*. 2017 Jun 1;161(6):521-527.
6. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res*. 2014 Jan;34(1):547-50.
7. Servillo L, et al. Determination of homoarginine, arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in biological samples by HPLC-ESI-mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 9;14(10):20131-8.

6. 学会発表

1. **Hotta Y**, Naiki-Ito A, Kitagawa A et al. 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.

7. 論文投稿

1. **Hotta Y**, Tomita N, Naiki-Ito A, et al. Urinary symmetric dimethylarginine reflects mild acute kidney injury induced by cisplatin in rats. (論文投稿中, *Toxicology*, 2020年4月)