

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 薬剤性急性腎障害から慢性腎臓病への進展を予測する新規評価分子の探索
(英語) Search for new molecules to predict progression to chronic kidney disease after drug-induced acute kidney injury

研究開発実施期間: 令和元年7月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 松下 幸平
(英語) Kohei Matsushita

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Pathology, Senior Researcher

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

医薬品等の安全性評価において病態の可逆性・回復性は極めて重要な要素である。腎臓はその生理学的な特徴から医薬品を含む化学物質による毒性を受けやすい臓器とされており、実際に腎毒性を有する薬剤は抗がん剤や抗生剤など多岐に渡る。これらは主に尿細管を標的として急性腎障害 (AKI) を引き起こすが、尿細管は再生能力を有するため AKI は可逆的な病態であると考えられてきた。しかしながら近年、AKI 後に尿細管の再生機構が破綻して線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病 (CKD) に移行する AKI to CKD という現象が明らかとなり、AKI の疾患概念が大きく見直されるようになった。よって、今後は医薬品の安全性評価および市販後安全性対策においても、薬剤性 AKI は必ずしも可逆的ではないという前提に基づいた規制が必要になると考えられる。

我々は尿細管の再生機構の破綻が線維化に先立って生じることに着目し、再生機構の破綻した尿細管に特異的に発現する因子は AKI to CKD の予測指標となるという仮説を立てた。そこで本研究では、再生機構の破綻した尿細管における遺伝子発現を網羅的に解析し、薬剤性 AKI の可逆性を早期に予測することができる新規評価分子を探索した。

2019年度はシスプラチンによる AKI to CKD モデルラットの作製条件を最適化するため、シスプラチンの至適投与用量を探索した。論文情報に基づき、6週齢の雄性 SD ラットに媒体である生理食塩水もしくはシスプラチンを 1、2、3 および 6 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し、5 及び 28 日後に剖検した。剖検時に腹大動脈から採血を行い、腎臓を採材して重量を測定した後、ホルマリン固定および瞬間凍結保存した。各時点に

において血清生化学的検査により血清尿素窒素および血清クレアチニン値を測定し、パラフィン包埋標本を用いた病理組織学的解析を実施した。投与後 5 日においては腎障害マーカーおよび病理検査における尿細管の変性/壊死を指標とし、シスプラチン投与による尿細管障害を評価した。28 日時点においてはこれらに加えてシリウスレッド染色を実施し、線維化の評価を行った。

その結果、5 日時点では全てのシスプラチン投与群において血清生化学的検査における腎障害バイオマーカーの有意な上昇あるいは上昇傾向が認められ、病理組織学的解析においては髄質外帯外層の近位尿細管直部に尿細管壊死やカリオメガリーといったシスプラチン投与による典型的な尿細管の変化が観察された。28 日時点においては、6 mg/kg 群においてのみ腎障害マーカーの上昇が認められた。シリウスレッド染色においては、膠原線維面積が 6 mg/kg 群において明らかに増加しており、3 mg/kg 群においても軽度ながら増加が認められた。膠原線維の増加が明らか部位においては、尿細管は拡張あるいは萎縮していた。カリオメガリーも全てのシスプラチン投与群で認められたものの、その発現頻度は 5 日時点と比較して減弱していた。

以上の結果より、AKI が生じた後に尿細管再生により組織が修復する動物モデル、及び AKI が生じた後に尿細管の再生機構が破綻して CKD に至る動物モデルを作製するためのシスプラチンの投与用量をそれぞれ 2 及び 6 mg/kg に決定した。

2020 年度は網羅的遺伝子発現解析により再生機構の破綻した尿細管に特異的に発現する因子を探索した。2019 年度に 6 mg/kg のシスプラチンを単回腹腔内投与して 28 日後に得られた腎臓組織を用いて凍結ブロックを作製し、迅速ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。凍結標本において線維化病変を確認しつつ、レーザーマイクロダイセクションにより病変内の拡張あるいは萎縮した尿細管を採取した。得られた尿細管サンプルから抽出した total RNA に増幅処置を施した後、マイクロアレイ解析を行った。対照サンプルとして、同実験の生理食塩水を投与したラット腎臓から凍結標本を作製し、正常尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取して、同様にサンプル調整を行った。マイクロアレイの結果、対照群の正常尿細管と比較してシスプラチン投与群の線維化病変内の拡張/萎縮尿細管において発現が上昇した遺伝子群から、再生機構破綻との関連が疑われる因子を中心に新規評価分子としての候補因子を探索した。得られた候補因子の詳細な遺伝子発現を解析するために qPCR を行い、さらに免疫組織学的手法を用いてタンパク発現の局在を確認した。

網羅的遺伝子発現解析の結果、拡張/萎縮尿細管では正常尿細管と比較して 722 遺伝子の発現が上昇しており、1097 遺伝子の発現が低下していた。発現上昇を示した遺伝子群から候補因子を抽出し、それらのタンパク発現を免疫染色により解析した。その結果、再生機構の破綻した尿細管に特異的に発現する因子としてがん幹細胞マーカーとして知られる CD44 を見出した。qPCR 解析では、正常尿細管と比較して拡張/萎縮尿細管では CD44 の発現が約 250 倍の上昇を示した。さらに Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った結果、CD44 は線維化に関わる複数の遺伝子群の発現を誘導していることが示唆された。この遺伝子群のうち細胞外基質である fibronectin の産生に関わる *Fn1* に着目して *in situ* hybridization および免疫染色を行った。その結果、線維化病変における拡張/萎縮尿細管の細胞質に *Fn1* の mRNA の発現がみられたことに対し、fibronectin タンパクの発現はそれらの尿細管の周囲間質に主座していた。よって、CD44 は尿細管において細胞外基質の産生を誘導し、線維化の病変形成に寄与しているものと考えられた。

2021 年度はシスプラチンによる AKI to CKD モデルラットを作製し、CD44 の発現動態を解析して AKI to CKD の予測指標としての有用性について検証した。2019 年度の実験結果に基づき、生理食塩水あるいは 2 および 6 mg/kg のシスプラチンを 6 週齢の雄性 SD ラットに単回腹腔内投与し、1、3、5、7、10、14 および 28 日後に剖検した。2 mg/kg 群では AKI 後に尿細管再生により腎組織が修復されるモデル、6 mg/kg 群では AKI to CKD モデルを誘発することを目的とした。剖検時に腎障害マーカーを測定するために腹大動脈から採血を行い、さらに腎臓を採材してホルマリン固定および凍結保存した。病理組織学的解析に加えてシリウスレッド染色を行い、AKI から CKD へ移行する過程における尿細管の形態および線維化の進展を経時的に観察し

た。また、2020年度の研究結果より AKI to CKD の予測指標としての候補因子として見出した CD44 の発現動態を免疫染色にて解析し、血清中 CD44 値を ELISA 法により解析した。さらに再生機構の破綻した尿細管の特徴を詳細に検討するため、2020年度と同様に *Fnl* の *in situ* hybridization および fibronectin の免疫染色を行った。

血清生化学的検査の結果、2 および 6 mg/kg 群ともに腎障害マーカーの発現は投与 5 日後にピークを示し、その後は減少したものの、6 mg/kg 群では対照群よりも高値傾向を示した。シリウスレッド染色による線維化の評価では、6 mg/kg 群において 10 日以降に膠原線維面積の有意な増加が認められた。病理組織学的解析では、2 および 6 mg/kg とともに 1-5 日に尿細管壊死に加えて核の chromatin margination およびカリオメガリーといったシスプラチン投与による典型的な組織像が観察された。2 mg/kg 群では 5 日から尿細管の再生像が観察され、28 日にかけて尿細管の再分化により組織が修復される像が観察された。一方、6 mg/kg 群においては 5 日以降に拡張した尿細管が多く観察され、10 日以降の線維化病変内には拡張した尿細管に加えて萎縮した尿細管も認められた。CD44 の免疫染色では 6 mg/kg 群の拡張/萎縮尿細管において明らかな陽性反応が確認され、さらに血清中の CD44 値も 6 mg/kg 群の 5 日以降に有意に上昇した。*Fnl* の *in situ* hybridization および fibronectin の免疫染色では、6 mg/kg 群の拡張/萎縮尿細管の細胞質に *Fnl* mRNA の発現亢進が認められ、fibronectin タンパクはそれらの尿細管の周囲間質に認められた。

以上より、CD44 は AKI 後に線維化に先立って腎臓および血中に発現したことから、腎障害の可逆性を早期に予測可能となる新規評価分子となる可能性が示された。また CD44 の病態生理学的役割として、再生機構の破綻した拡張/萎縮尿細管において細胞外基質の分泌を誘導し、線維化病変の形成に早期から関与していることが考えられた。

今後は CD44 の有用性をさらに検証するため、尿中 CD44 の発現解析や他の薬剤による AKI to CKD モデルを用いた検証、さらにはヒト CKD 症例の腎臓、血中および尿中の CD44 発現解析を行う予定である。それらのデータを統合し、最終的には既存の腎障害バイオマーカーとの組み合わせも含め AKI to CKD の総合的な予測方法を確立したいと考える。薬剤性 AKI の可逆性を予測する手法を確立することができれば、腎障害は可逆的との前提に基づいた現在の規制の概念を事実即したものに変わることができると期待されるため、レギュラトリーサイエンスの促進に大きく貢献できるものと期待される。

Reversibility is an important factor in terms of safety assessment of pharmaceuticals. Kidney is a major target organ for drug-induced toxicity due to its physiological roles, and there are a wide variety of drugs displaying nephrotoxicity, such as anticancer drugs and antibiotics. Nephrotoxicants mainly cause renal tubular damage, resulting in acute kidney injury (AKI). Because renal tubular cells have intrinsic capacity for regeneration, AKI have been considered to be reversible condition. However, emerging evidences indicated that maladaptive repair of renal tubules after AKI leads to irreversible fibrosis, resulting in chronic kidney disease (CKD). Therefore, regulations based on the premise that drug-induced AKI is not necessarily reversible condition could be required in terms of safety assessment of pharmaceuticals and post-marketing safety measures.

Based on the fact that maladaptive repair of renal tubules occurs prior to fibrosis, we hypothesized that factors especially expressing in renal tubules during maladaptive repair could be a predictive factor for AKI to CKD. In the current study, we analyzed the gene expression profiles of renal tubules during maladaptive repair using microarray to identify the factors capable of predicting reversibility of drug-induced AKI.

In 2019, we investigated the optimal dosage of cisplatin to establish AKI to CKD model rats.

Six-week-old male SD rats were intraperitoneally injected cisplatin at a dose of 0 (saline), 1, 2, 3, and 6 mg/kg. Rats were necropsied at 5 and 28 days after cisplatin injection.

At day 5, typical lesions of kidneys of rats treated with cisplatin, renal tubular necrosis and karyomegaly, were observed in all cisplatin-treated groups. At day 28, Sirius red staining revealed that increase of collagen fibers in interstitium were observed slightly and markedly in 3 and 6 mg/kg group, respectively. In 6 mg/kg group, renal tubules in fibrotic area were dilated or atrophied. Based on these results, we determined the doses of cisplatin as 2 and 6 mg/kg to develop the adaptive and maladaptive repair models, respectively.

In 2020, we investigated the factors especially expressed in renal tubules during maladaptive repair using comprehensive gene expression analysis. Dilated/atrophic tubules in fibrotic area of kidneys of rats treated with 6 mg/kg of cisplatin were collected followed by total RNA extraction. After amplification of the total RNA, microarray analysis was performed. Among the upregulated genes, we focused on CD44, a cancer stem cell marker. qPCR analysis showed an approximately 250-folds increase in CD44 expression in the dilated/atrophic tubules. Immunohistochemistry revealed clear expression of CD44 in dilated/atrophic tubules. Pathway analysis using Ingenuity Pathway Analysis suggested that CD44 is upstream factor of fibrosis-related genes. Among the downstream factors of CD44, we focused *Fnl*, encoding extracellular matrix fibronectin. *in situ* hybridization showed expression of *Fnl* in cytoplasm of dilated/atrophic tubules, while immunohistochemistry revealed that fibronectin was mainly located around dilated/atrophic tubules. These results suggested CD44 contribute development of fibrosis by induce production of extracellular matrix in renal tubules during maladaptive repair.

In 2021, we investigated the kinetics of CD44 expression in AKI to CKD model rats. Six-week-old male SD rats were intraperitoneally injected 0 (saline), 2, and 6 mg/kg of cisplatin, and sacrificed at 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 28 days after injection. From day 1 to 5, there were degeneration/necrosis of renal tubules in 2 and 6 mg/kg groups. In 2 mg/kg group, kidneys were repaired from day 5 to 28. In 6 mg/kg group, dilated tubules were detected after day 5, and there was fibrosis with dilated/atrophic tubules after day 10. CD44 was expressed in dilated/atrophic tubules in 6 mg/kg group. Serum CD44 level was significantly increased in 6 mg/kg group at day 5, 7, and 28. Expression of *Fnl* was detected in cytoplasm of dilated/atrophic tubules, while fibronectin protein was mainly located around dilated/atrophic tubules from day 5. These results suggested that CD44 contributes development of CKD from an early stage.

In the current study, CD44 was expressed in the kidney and serum prior to fibrosis, indicating the potential of CD44 as a biomarker capable of predicting AKI to CKD. In the future, to demonstrate the usefulness of CD44 as a biomarker to predict AKI to CKD, we will analyze the expression of CD44 in kidney, serum, and urine in the AKI to CKD model rats induced by other nephrotoxicants and human CKD cases.