

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）三次元培養ヒト近位尿細管上皮細胞を用いた薬物誘発性腎障害 *in vitro* 評価手法の開発

（英 語）Construction of *in vitro* assay for drug-induced kidney injury using three-dimensional cultured human proximal tubular epithelial cells

研究開発実施期間：令和 5 年 7 月 20 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）荒川 大
（英 語）Hiroshi Arakawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）公立大学法人名古屋市立大学・レギュラトリーサイエンス分野・教授
（英 語）Regulatory Science, Nagoya City University, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

薬物誘発性腎障害（drug-induced kidney injury: DIKI）は、急性腎障害の主要な原因の一つであり、臨床現場における薬物治療継続の制限因子となるだけでなく、医薬品開発においても開発中止要因となる重要な毒性である。特に近位尿細管上皮細胞（renal proximal tubular epithelial cells: RPTEC）は、薬物トランスポーターを高発現し、薬物や代謝物の曝露を強く受けることから、DIKI の主たる標的細胞として知られている。一方、従来の実験動物を用いた腎毒性評価では、薬物トランスポーターや代謝応答に種差が存在するため、ヒトにおける腎毒性を十分に予測できないことが課題とされてきた。また、従来広く利用されてきた二次元培養ヒト近位尿細管上皮細胞（2D-RPTEC）や HK-2 細胞などの不死化細胞株では、OAT1 や OCT2 など主要薬物トランスポーターの発現が低く、ヒト腎臓に近い薬物応答性や代謝状態を十分に再現できないことが問題となっていた。本研究では、ヒト腎皮質に近い薬物トランスポーター発現を示す三次元培養ヒト近位尿細管上皮細胞（3D-RPTEC）を用

い、ヒト近位尿細管障害を高感度に検出可能な *in vitro* DIKI 評価系の構築を目的とした。さらに、単なる急性細胞毒性評価に留まらず、DIKI から慢性腎臓病 (CKD) への進展 (DIKI to CKD) の可逆性評価、および薬物トランスポーター発現変動による DIKI 感受性変化を評価可能な新規評価系の構築を目指した。

まず、DIKI 評価手法の高感度化および最適化を行った。過去の AMED-RS 研究では、細胞内 ATP 量の減少およびミトコンドリア膜電位などを指標とした画像診断を組み合わせることで 78.6% の感度を有する DIKI 評価系を構築していた。しかし、その解析には糸球体障害型化合物や代謝活性化依存型化合物など、近位尿細管障害とは異なる病態を主とする薬物が含まれていた。そこで本研究では、対象化合物について改めて文献調査を行い、近位尿細管障害性に基づき陽性・陰性化合物を再分類した。その上で、薬物 7 日間曝露後の細胞内 ATP 量 20% 減少濃度 (EC20) と臨床最大血中濃度 (Cmax) の比を指標として解析を行った。その結果、EC20/Cmax を 100 倍以内とした場合に sensitivity 82.4%、specificity 100% を示した。また ROC 解析により感度・特異度が最大化される評価基準を検討した結果、EC20/Cmax = 1160 において sensitivity 88.2%、specificity 100% を示した。このため、当初目標としていた 85% 以上の感度を有する DIKI 評価手法として確立することに成功した。

加えて、3D-RPTEC が保持する薬物トランスポーター機能について詳細な解析を行った。これまで評価可能であることを示してきた OAT1 および OCT2 に加え、MATE1/2K および megalin を介した輸送機能の評価した。その結果、MATE1/2K 基質 oxaliplatin による ATP 低下作用は MATE 阻害剤 cimetidine により軽減した。また、metformin 輸送試験では、血液側および管腔側からの取り込みが cimetidine 添加により低下し、MATE1/2K 依存的な輸送活性が確認された。さらに、megalin 基質 albumin 取り込み試験では、megalin 阻害剤 cilastatin により取り込み低下が観察され、3D-RPTEC が近位尿細管特有の再吸収機能を保持していることが示された。これらの結果から、本細胞系が単なる細胞毒性試験系ではなく、ヒト近位尿細管に近い薬物動態機能を有する生理学的モデルであることが明らかとなった。

社会的意義の高い成果として、小林製薬の紅麹サプリメント問題に関連し、原因候補物質であるプベルル酸の腎毒性評価を実施した。国立医薬品食品衛生研究所において、プベルル酸投与ラットで近位尿細管障害が観察されていた一方、ヒト近位尿細管上皮細胞に対する直接毒性は明らかでなかった。そこで 3D-RPTEC を用いて検討した結果、プベルル酸は濃度依存的かつ時間依存的に細胞内 ATP 量を低下させることが明らかとなった。また、有機アニオントランスポーター阻害剤 probenecid により毒性が軽減したことから、OAT1 などの有機アニオントランスポーターを介した細胞内取り込みが毒性発現に関与する可能性が示唆された。本成果は、社会問題化した健康食品関連腎障害について、ヒト細胞を用いた機序解析に貢献する重要な知見となった。

本研究では、評価系の再現性および技術移転性についても検討を行った。製薬企業 3 社、食品企業 1 社、CRO2 社が参加する ring study を実施し、複数施設における実験再現性を評価した。陽性対照化合物として adefovir、cephalothin、cisplatin、vancomycin、陰性対照として mannitol を用いた細胞毒性試験を行った結果、施設間で概ね同様の毒性応答が得られ、高い再現性および技術移転性が確認された。また、ロット間再現性についても複数ドナー由来細胞を用いて検討し、概ね同等の応答性が得られた。これらの結果は、本評価系が単一研究室内に留まらず、製薬企業や他施設でも利用可能な頑健な評価系となりうることを示している。

さらに、DIKI から慢性腎臓病 (CKD) への進展機構およびその可逆性評価法の構築を目的として、allopurinol および cyclosporine A を用いた 2 種類の DIKI to CKD モデルラットを作製し、再生異常尿細管および線維化形成に着目した解析を行った。DIKI では、急性障害後に尿細管再生が正常に

進行すれば腎機能は回復する一方、再生異常が持続した場合には線維化を伴う CKD へ移行する。しかし、DIKI から CKD への移行過程を反映する指標は十分に確立されていないことから、本研究では再生異常尿細管マーカーとして CD44 に着目した。Allopurinol 誘発モデルでは、14 日以降に間質線維化の有意な増加が認められ、5 日以降には拡張尿細管、14 日以降には萎縮尿細管も観察された。これら異常尿細管では CD44 陽性反応が認められ、さらに近位尿細管分化マーカー aquaporin 1 の発現低下、間葉系マーカー vimentin の発現、および fibronectin 産生に関与する Fn1 mRNA 発現増加が認められた。また、fibronectin タンパクは尿細管周囲間質に沈着していた。一方、異常尿細管は基底膜に覆われており、完全な上皮間葉転換ではなく partial EMT 様変化が生じている可能性が示唆された。血清 CD44 値は 5 日および 28 日で上昇傾向あるいは有意な上昇を示し、CD44 陽性尿細管数と正の相関を示した。また、BUN および血清クレアチニンも上昇傾向を示した。Cyclosporine A 誘発モデルにおいても同様に、21 日以降に線維化が認められ、10 日以降には肥大、拡張および萎縮尿細管が観察された。これら異常尿細管では CD44 発現、aquaporin 1 低下、vimentin 発現、Fn1 mRNA 増加および fibronectin 沈着が認められた。また、血清 CD44 値は 10 日および 28 日で上昇し、CD44 陽性尿細管数と相関を示した。BUN および血清クレアチニンについても上昇傾向あるいは有意な上昇を示した。以上、2 種類の DIKI to CKD モデルを用いた検討により、CD44 は線維化形成に先立って再生異常尿細管に発現し、さらに血清中でも検出可能であることが明らかとなった。このため、CD44 は DIKI 可逆性および CKD 進展を評価する新規組織・血清バイオマーカーとなる可能性が示された。また、再生異常尿細管では partial EMT 様変化が生じている可能性が示唆され、DIKI から CKD への進展機構の理解に重要な知見を与える成果となった。

加えて、薬物トランスポーター発現変動による DIKI 感受性変化についても検討を行った。FXR 活性化により OAT1、OAT3 および MATE2K 発現が低下し、それに伴い tenofovir などの取り込みおよび細胞毒性が軽減した。また、3D-RPTEC を用いて低酸素環境が薬物トランスポーター発現および DIKI 感受性に及ぼす影響とその分子機構について解析した。その結果、1% O₂ 条件下で培養した 3D-RPTEC では、OAT1 および OCT2 をはじめとする主要な薬物トランスポーターの mRNA 発現量が有意に低下した。また、網羅的プロテオーム解析においても、これらトランスポータータンパク質発現量の低下に加え、「低分子輸送」に関連するタンパク質群全体の広範な抑制が認められた。機能的検討として、OAT1 基質であるアデホビルを用いたところ、低酸素条件下では細胞内蓄積量が低下し、それに伴い細胞毒性も軽減した。さらに、CUT & RUN 法を用いて OAT1 発現調節機構を解析し、核内受容体を介した転写制御が薬物応答性に大きく関与することを明らかにした。

以上、本研究では、ヒト近位尿細管に近い薬物動態特性および細胞応答性を有する 3D-RPTEC を用いることで、高感度かつ生理学的妥当性の高い *in vitro* DIKI 評価系を構築した。得られた成果は、医薬品開発におけるヒト予測性向上に貢献するのみならず、実験動物使用削減に資する代替法としても重要な意義を有する。また、急性毒性のみならず DIKI から CKD への進展評価やトランスポーター発現変動を考慮した新規毒性評価概念を提案した点において、今後の腎毒性評価研究および規制科学に大きく貢献することが期待される。

英文：

Drug-induced kidney injury (DIKI) is a major cause of acute kidney injury and a significant reason for drug attrition during pharmaceutical development. Renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs) are highly susceptible to DIKI because they express various drug transporters involved in renal drug disposition. However, conventional animal studies often fail to accurately predict human DIKI due to species differences in transporter

expression and cellular responses. In addition, conventional two-dimensional cultured RPTECs and immortalized cell lines such as HK-2 cells exhibit low expression of major renal drug transporters and insufficient physiological responses, limiting their predictive performance. In this study, we established an in vitro DIKI evaluation system using three-dimensional cultured human RPTECs (3D-RPTECs), which exhibit transporter expression profiles closer to those of the human renal cortex. We aimed not only to improve the sensitivity of acute DIKI detection but also to evaluate reversibility of DIKI progression toward chronic kidney disease (CKD) and changes in DIKI susceptibility associated with altered transporter expression. Re-analysis and optimization of the ATP-based toxicity assay improved the predictive performance of the system. By redefining nephrotoxic positive and negative compounds based on proximal tubular injury mechanisms and using the ratio of EC20 to clinical maximum plasma concentration (C_{max}) as an evaluation index, the system achieved a sensitivity of 88.2% and specificity of 100%. These results exceeded the original target sensitivity of 85%. In addition to OAT1 and OCT2, the system successfully evaluated MATE1/2K- and megalin-mediated toxic responses. Furthermore, exposure to puberulic acid, a candidate nephrotoxic compound associated with red yeast rice supplement-related kidney injury, caused concentration- and time-dependent ATP reduction in 3D-RPTECs. The toxicity was attenuated by probenecid, suggesting the involvement of organic anion transporters such as OAT1. To validate robustness and transferability, a ring study involving pharmaceutical companies, food companies, and CROs was conducted, demonstrating high inter-laboratory reproducibility. In parallel, allopurinol- and cyclosporine A-induced DIKI-to-CKD rat models were established. These models exhibited tubular dilation, atrophy, fibrosis, and increased CD44-positive tubules associated with dedifferentiation and mesenchymal transition markers. Serum CD44 levels correlated with renal CD44-positive tubules, suggesting its utility as a biomarker for DIKI reversibility and CKD progression. Additionally, activation of FXR altered transporter expression, including OAT1, OAT3, and MATE2K, resulting in decreased uptake and toxicity of nephrotoxic drugs such as tenofovir. CUT & RUN analysis further revealed regulatory mechanisms underlying transporter expression changes and DIKI susceptibility. Collectively, this study established a highly sensitive and physiologically relevant in vitro DIKI evaluation platform using 3D-RPTECs. The findings contribute to improved human predictability in drug safety assessment, reduction of animal usage, and future international standardization of in vitro nephrotoxicity testing.