

研究報告書  
2019年度：B課題

2021年 4月 27日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 名古屋市立大学病院 薬剤部

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

研究者氏名 真川 明将



(研究課題)

抗がん剤の腎障害における腎老化細胞の役割に関する基礎的研究

---

2020年1月24日付助成金交付のあった標記B課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【背景・目的】

加齢・老化は、がんのみならず多くの疾患発症のリスク因子である。一般に、がん患者は高齢で、薬剤・排泄能力が低下しているだけでなく、腎細胞自体の老化により腎毒物への抵抗性が低下していることが予想される。シスプラチンは1980年代から使用されている有用性の高い抗悪性腫瘍薬であり、現在も咽頭がんや尿路上皮がん等のさまざまな癌に対する化学療法に使用されている。しかしながら、腎臓の近位尿細管に蓄積しやすく、腎障害の報告が散見される。当然のことながら、加齢はシスプラチン腎障害のリスク因子であり、年齢が上昇するにつれその発症率も高くなることが知られている。

近年、細胞老化という生命現象が注目され、腎臓においても老化の特徴を有する尿細管細胞が確認されている。この老化尿細管細胞の生理学的な役割は不明な点が多く、多くの研究者が研究をおこなっている。我々は、培養皿でヒト腎臓由来の近位尿細管上皮の初代培養細胞を繰り返し継代したときに、細胞老化マーカーである老化関連ベータガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ -gal) が陽性となる細胞が漸増していくことを確認している。

本研究では、この老化尿細管細胞がシスプラチンに対してどのような反応を示すのか検討することを目的とした。

## 【方法・結果】

### 1. 近位尿細管培養細胞の継代数と細胞老化マーカーの評価

ヒト正常腎由来の初代培養細胞である、近位尿細管上皮細胞 (Renal Proximal Tubule Epithelial Cells; RPTEC) (Lonza, Basel, Switzerland) を用いた。培地には REGM™ Renal Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit™ (Lonza) を用いて、4日毎に継代をおこなった。細胞老化は、各継代数ごとの SA- $\beta$ -gal 陽性細胞率にて判定した。

細胞老化マーカーである SA- $\beta$ -gal の陽性細胞率は、図1に示すように継代数の増加に伴い上昇することが明らかになった。

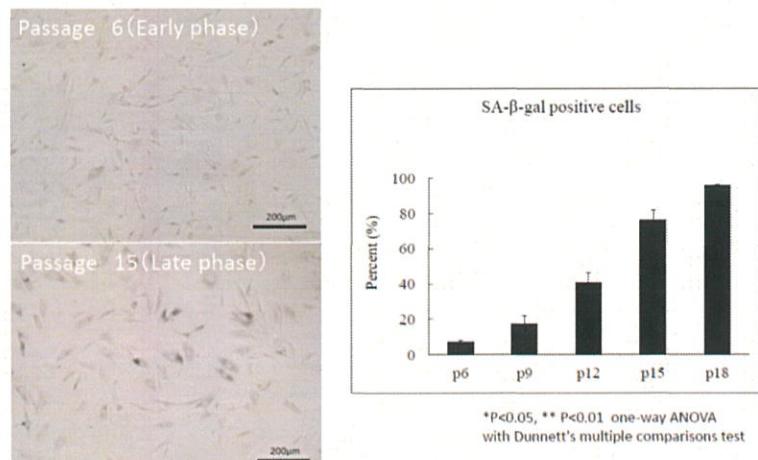


図1. 継代数と SA- $\beta$ -gal 陽性細胞数の割合

### 2. 老化尿細管に対するシスプラチンの細胞毒性評価

細胞生存率の検討には Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いた。96well プレートに  $7 \times 10^3$  個/well の細胞を播種し 24 時間培養した。そして薬剤を添加し、さらに 22 時間培養した。その後、3 セット作成したのコントロールの刺激を行った細胞のうち 1 セットに Lysis buffer を添加し、30 分間インキュベートすることで High Control 群を作成した。すべての well に CCK-8 を添加し、2 時間インキュベートした後に多機能プレートリーダー (Nivo 3S, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, US) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。これらはすべて

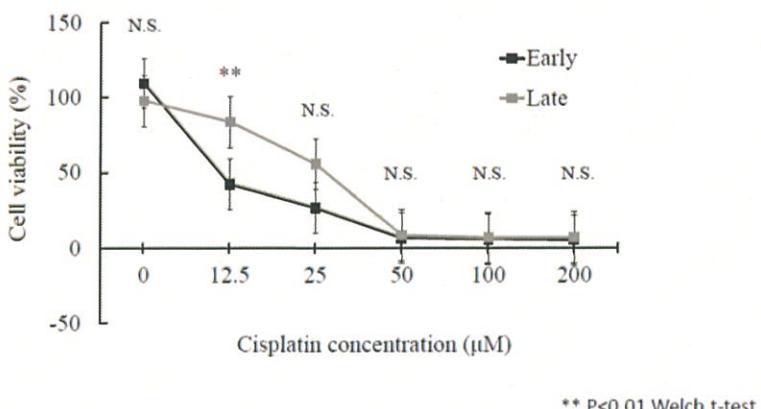
Tripplicateで検討を行った。コントロール群における細胞生存率を100%、High Control群における細胞生存率を0%として、これらに対する比率を算出した。

継代数の若い尿細管細胞（Early : Passage9以下）と継代数の多い老化尿細管細胞（Late : Passage12以上）で、シスプラチニ曝露による細胞生存率の変化を図2に示す。シスプラチニ12.5 μMに曝露した際、若い尿細管細胞にくらべて老化尿細管細胞は細胞生存率が高い傾向が得られた。

### 3. 老化尿細管の薬物輸送系評価

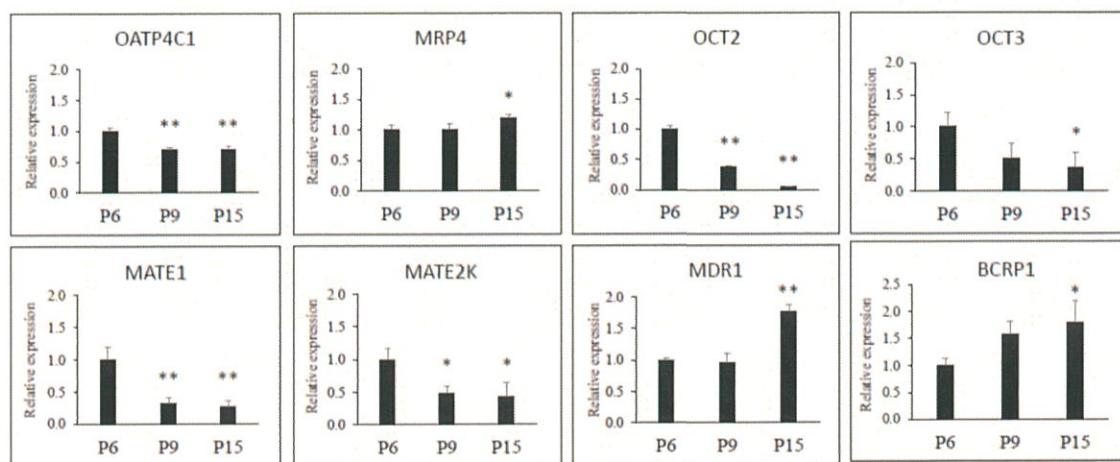
老化尿細管細胞と若い尿細管細胞で、薬物トランスポーターの発現に変化が生じるか定量リアルタイムPCR法によりmRNA発現量の評価をおこなった。継代数の増加に伴ってmRNA発現量に有意な差がみられた輸送体についてに図3に示す。mRNA変化量に着目すると、最も発現量の差が大きかった輸送体は有機カチオントランスポーターOCT2であった。

また、カチオン性の蛍光基質の取り込み評価をおこなった。HBSSにカチオン性の蛍光基質である(ASP+)、Rhodamine123を溶解し、30分取り込みを行ったのち、4°CのHBSSで取り込みを停止した。その後、SA-β-gal染色をおこない蛍光顕微鏡で観察したところ、これらの蛍光基質の取り込みは、SA-β-gal陽性細胞で低下していることが観察された。



\*\* P<0.01 Welch t-test

図2. 老化尿細管細胞におけるシスプラチニ毒性



\*P<0.05, \*\*P<0.01 one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test

図3. 老化尿細管細胞に薬物トランスポーターmRNA発現量の変動

以上、老化尿細管細胞に対するシスプラチニの毒性発現を評価しました。本研究の内容につきましては、学会および学術専門誌にて発表していく予定です。

### 【学会発表】

1. 真川明将, 森菜々香, 富田なつみ, 堀田祐志, 木村和哲  
BRAF 阻害薬ベムラフェニブの尿細管毒性の *in vitro* 評価  
第30回日本医療薬学会年会
2. 森悠香梨, 真川明将, 早川智章, 堀田祐志, 木村和哲  
ベキサロテン投与に起因する重篤な高 TG 血症リスク因子の探索  
日本臨床腫瘍学会学術大会 2020 (抄録)

### 【発表論文】

1. Kondo M, Hotta Y, Yamauchi K, Sanagawa A, Komatsu K, Iida S, Kimura K.  
Bortezomib administration is a risk factor associated with the development of tumor lysis syndrome in male patients with multiple myeloma: a retrospective study.  
*BMC Cancer* 2020; 20(1): 1117. 査読有り
2. Sanagawa A, Hotta Y, Kondo M, Nishikawa R, Tohkin M, Kimura K.  
Tumor lysis syndrome associated with bortezomib: A post hoc analysis after signal detection using the United States Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System.  
*Anti-Cancer Drugs* 2020; 31(2): 183-189. 査読有り

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。