

特集 バイオマーカー探索を指向した先端的薬学研究 —その1—

シスプラチン腎症に伴う soluble epoxide hydrolase (sEH) の変動と バイオマーカーとしての可能性

昭和大学薬学部生体制御機能薬学講座薬理学部門

橋本 光正 本田 一男

はじめに

アラキドン酸は, cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) あるいは cytochrome P-450 (CYP) により種々のエイコサノイドへ代謝される. CYP 経路の代謝物である epoxyeicosatrienoic acids (EETs) は, 血管弛緩作用, 抗炎症作用, アポトーシス抑制等種々の生理活性を示すことが報告されている¹⁾. この EETs を dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs) へ代謝する酵素が soluble epoxide hydrolase (sEH) であり, sEH の阻害薬が血圧下降作用²⁾, 腎における虚血再灌流障害抑制³⁾を示すことが報告されている (図 1). これらの結果は EETs の DHETs への代謝の阻害に起因すると推察され, sEH の阻害薬の新たな治療薬としての可能性が期待されている.

一方, シスプラチンは抗腫瘍スペクトルが広く, 抗腫瘍効果も高いため, がん治療において使用頻度の高い薬物の 1 つである. しかし, 吐気・嘔吐, 骨髄抑制などの副作用が強く, 中でも腎症は患者に深刻な影響を及ぼすため本剤の用量規制因子の 1 つとなっており, 腎症の発症抑制は重要な課題となっている⁴⁾. 腎組織中の sEH の発現は高く, 主として近位尿細管細胞に分布していることが報告されており⁵⁾, さらに, EETs アナログの投与⁶⁾あるいは sEH をコードする *EPHX2* のノックアウト動物⁷⁾ではシスプラチン腎症が抑制されることより, EETs, sEH はシスプラチン腎症の病態に深く関与しているものと推察される. 本稿では, シスプラチン腎症モデル動物における sEH および *EPHX2* の変動について論じる.

シスプラチン腎症モデルにおける sEH および *EPHX2* の変動

ddY 系雄性マウスにシスプラチン 20 mg/kg を持続静脈内投与することにより, 投与 3 日後には血中尿素窒素 (BUN), 血清クレアチニン (sCr) の有意な上昇が認められ, 腎症の発症が確認された. 同時に腎組織サンプルの調製を行い, Sep-pak C-18 カラムを用いて部分精製の後, LC-MS-MS を用いアラキドン酸代謝物の分析を行なったところ, NF- κ B 経路抑制が報告されている⁸⁾ 11(12)-EET およびその代謝物である 11(12)-DHET の比 (EET/DHET) の上昇が認められた. さらに, 酸化ストレスの指標である腎組織中の Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値の上昇も認められ, シスプラチン腎症発症時には sEH 活性は低下, 酸化ストレスは上昇しているものと推察された. さらに, 蛍光抗体を用い sEH の局在について検討したところ, 蛍光領域は近位尿細管部分に局在しており, 糸球体には認められなかった. この蛍光領域は, シスプラチン投与により消失した. また *EPHX2* の発現は, シスプラチン投与動物では有意に低下していた.

前述の様に, EETs, sEH は新たな治療ターゲットとして注目されているが, 病態下の変動については相反する報告がなされている. Streptozotocin (STZ) 投与による I 型糖尿病マウスにおいて, 腎組織の sEH 発現は低下しており, その低下は活性酸素種 (ROS) 依存的である⁹⁾と報告されている一方, sEH の発現に明らかな変化は認められず, EET/DHET は低下するとの報告もある¹⁰⁾. また, 腎においては虚血再灌流に伴い sEH の発現は低下することが報告がさ

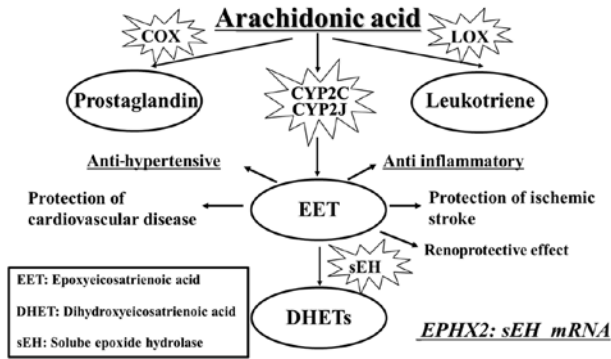


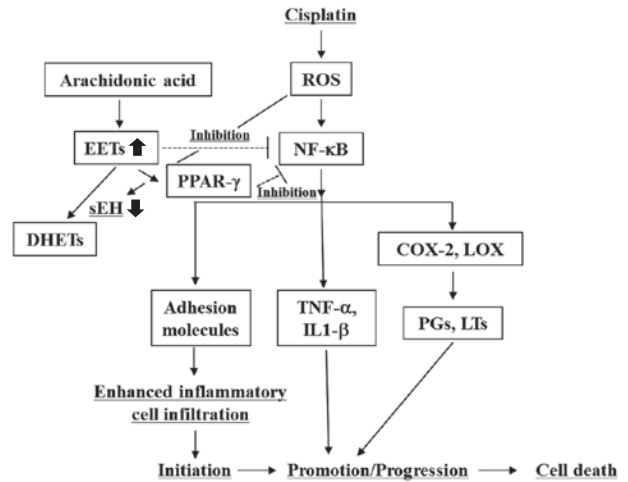
図 1 アラキドン酸カスケードと EETs, sEH

れているが³⁾, 脳組織の EET および sEH 発現量は虚血再灌流で変化しないとの報告もある¹¹⁾. これらの相違の詳細は不明であるが, 刺激条件 (STZ の投与量, 虚血時間) の相違が一要因と思われる. また, 本検討でのシスプラチン腎症時の EET/DHET 値の上昇は *EPHX2* の down-regulation に基く sEH の発現低下に起因するものと考えられた.

sEH および *EPHX2* の変動と腎機能変化の相関性

シスプラチン投与による腎組織中 EET/DHET 値, *EPHX2* の発現と BUN 変動の相関性について検討したところ, EET/DHET 値と BUN の間には有意な正の相関が ($r = 0.83, p < 0.01$), *EPHX2* の発現と BUN の間には有意な負の相関が認められた ($r = 0.87, p < 0.01$). また, *EPHX2* の発現と TBARS 値の間にも有意な負の相関が認められた ($r = 0.75, p < 0.01$). 以上の結果より, *EPHX2* の発現は酸化ストレス依存的に低下すること, さらに, 腎機能低下に伴い, *EPHX2* の down-regulation とそれに基づく sEH 活性の低下が惹起されるものと推察された.

シスプラチン腎症発症機序には不明な部分もあるが, ROS の産生と NF- κ B 経路の活性化さらには, TNF- α 等のサイトカインの産生が関与するものと考えられている. 前述の様に, *EPHX2* のノックアウト動物ではシスプラチン投与による BUN の上昇, NF- κ B 経路の活性化は抑制されることが報告されていること⁷⁾, EETs が NF- κ B 経路を抑制することを考え合わせると⁸⁾, シスプラチン投与による *EPHX2* の down-regulation と sEH 活性の低下は, 腎機能低下に対する負のフィードバック制御である可能性が示唆された (図 2).



↑ Up-regulation
↓ Down-regulation

図 2 シスプラチン腎症の発症機序と EETs によるフィードバック制御作用

腎組織中 *EPHX2* 変動の経時推移

シスプラチン 20 mg/kg の投与による腎組織中の *EPHX2* および腎機能の指標としての BUN の経時推移を検討したところ, BUN は投与 1 および 2 日後では明らかな変化が認められなかったが, 投与 3 日後には投与直後に比し有意な上昇が認められた. 一方, 腎組織中の *EPHX2* 発現は, 投与 1 日後より有意な低下が認められ, 2 および 3 日後とその低下は持続していた. また, 10 mg/kg 投与においては, BUN の上昇は認められなかったが, 腎組織中の *EPHX2* 発現は経時的に低下し, 投与 2 および 3 日後では投与前との間に有意差が認められた. 酸化ストレスの指標である腎組織中 TBARS 値はシスプラチン (10 および 20 mg/kg), 投与直後より有意に上昇することが確認されている¹²⁾. 前述の様に酸化ストレスの上昇に伴って *EPHX2* の発現は低下するため, BUN に変動の認められる前 (シスプラチン投与直後) あるいは BUN の上昇が惹起されない用量においても, その発現の変動が認められるものと推察された.

シスプラチン腎症モデルにおける血中 sEH の変動

シスプラチン腎症発症時に酸化ストレス依存的に伴い腎組織中 *EPHX2* の発現は低下し, その結果, sEH の発現・活性は低下する可能性が示唆された.

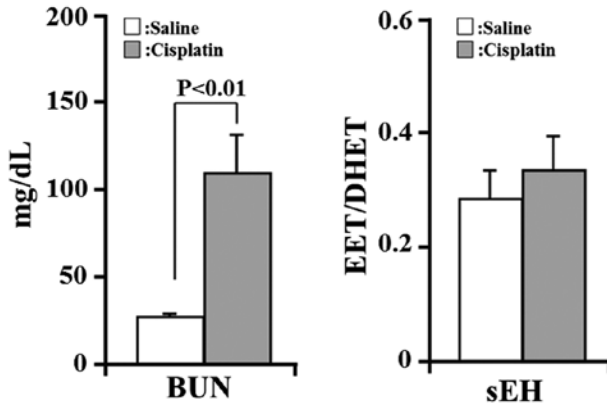


図3 シスプラチン腎症モデルにおけるBUNおよび血清中sEH活性の変化
シスプラチンを20 mg/kgを体重35～40 gの雄性ddy系マウスに静脈内投与し、3日後に採血、各パラメーターの測定を行なった。各カラムは8例の平均値±標準誤差を示す。

さらに、*EPHX2*の発現低下はBUNの変動前あるいはBUNの変動が惹起されない程度の投与量であっても認められることが明らかとなった。従来より腎障害のバイオマーカーとしてBUN、sCrが用いられているが、これらが異常値を示すのは腎障害の進行後であり、早期に腎毒性を検出することは困難である。よって、血中sEH活性の変動が腎組織と同様にBUNの変動が惹起されない程度の傷害においても認められれば、血中sEH活性の測定はシスプラチン腎症のバイオマーカーと成り得るものと推察された。そこでシスプラチン20 mg/kgを持続静脈内投与し、血清中アラキドン酸代謝物の分析を行ないEET/DHET値を算出した。しかし、明らかに腎症が発症している投与3日後においてもEET/DHET値の明らかな変動は認められなかった(図3)。

まとめ

シスプラチン腎症発症時には、*EPHX2*が酸化ストレスに伴い低下し、sEHの発現・活性低下を介しEETの代謝を抑制している可能性が示唆された。EETが腎保護作用を有すること、さらに*EPHX2*の発現低下はBUNの変動前あるいはBUNの変動が惹起されない程度の投与量であっても認められることより、これらの変化は腎機能低下に対する負のフィードバック制御である可能性が示唆された。一方、血清中sEH活性は腎症発症時にも明らかな変動

が認められなかったことより、シスプラチン腎症のマーカーとしての可能性は低いものと推察された。近年、シスプラチン腎症に伴い、L型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)およびLidney injury molecule-1(Kim-1)の尿中排泄が増加することが報告されている^{13,14)}、よって、sEH活性に関しても尿中での変動の検討を行い、そのバイオマーカーとしての可能性について評価して行く必要があると思われる。

前述のように、腎障害のバイオマーカーとしてのBUN、sCrが異常値を示すのは腎障害の進行後であり、早期に腎毒性を検出することは困難である。この観点から、近年、新規腎障害バイオマーカーの検索が行なわれている。新たなバイオマーカーの確立は腎疾患の早期発見および新規腎疾患治療薬の開発に結びついて行くものと思われる。

文 献

- 1) Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C996-C1012.
- 2) Yu Z, Xu F, Huse LM, et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res.* 2000;87:992-998.
- 3) Lee JP, Yang SH, Lee HY, et al. Soluble epoxide hydrolase activity determines the severity of ischemia-reperfusion injury in kidney. *PLoS One.* 2012;7:e37075.
- 4) Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med.* 1978;65:307-314.
- 5) Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, et al. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:447-454.
- 6) Khan MA, Liu J, Kumar G, et al. Novel orally active epoxyeicosatrienoic acid (EET) analogs attenuate cisplatin nephrotoxicity. *FASEB J.* 2013;27:2946-2956.
- 7) Liu Y, Webb HK, Fukushima H, et al. Attenuation of cisplatin-induced renal injury by inhibition of soluble epoxide hydrolase involves nuclear factor κ B signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;34:725-734.
- 8) Node K, Huo Y, Ruan X, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science.* 1999;47:1276-1279.
- 9) Oguro A, Fujita N, Imaoka S. Regulation of soluble epoxide hydrolase (sEH) in mice with

- diabetes: high glucose suppresses sEH expression. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24:438-445.
- 10) Elmarakby AA, Faulkner J, Al-Shabrawey M, *et al.* Deletion of soluble epoxide hydrolase gene improves renal endothelial function and reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301:R1307-R1317.
 - 11) Wang SB, Pang XB, Gao M, *et al.* Pinocembrin protects rats against cerebral ischemic damage through soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids. *Chin J Nat Med.* 2013; 11:207-213.
 - 12) 橋本光正, 本田一男. シスプラチン腎症モデルマウスにおける Epx-2 の変動. 腎とフリーラジカル研究会抄録集. 2013;25:30.
 - 13) Negishi K, Noiri E, Doi K, *et al.* Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am J Pathol.* 2009;174:1203-1211.
 - 14) Hosohata K, Ando H, Fujimura A. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;341:356-662.
- [受付 : 12 月 8 日, 2014, 受理 : 2 月 5 日, 2015]