

アミノグリコシドの腎特異的蓄積を規定する分子機構の解析とそれに基づく腎毒性のない新規アミノグリコシド製剤開発の試み

永井 純也

Molecular Mechanisms Underlying Renal Accumulation of Aminoglycoside Antibiotics and Mechanism-based Approach for Developing Nonnephrotoxic Aminoglycoside Therapy

Junya NAGAI

Department of Pharmaceutics and Therapeutics, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

(Received February 20, 2006)

Aminoglycoside antibiotics, such as gentamicin and amikacin, are a class of clinically important antibiotics used worldwide in the treatment of infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, nephrotoxicity and ototoxicity are serious problems in the use of aminoglycosides and are the major dose-limiting side effects. Most of the intravenously administered dose is excreted into the urine, whereas some of the aminoglycoside injected (about 10% of the dose) is selectively accumulated in the renal cortex, leading to renal injury. Aminoglycosides are taken up into the epithelial cells of the renal proximal tubules by an endocytic pathway. Acidic phospholipids, broadly distributed in the plasma membranes in various tissues, were considered to be the binding site of aminoglycosides. Recently, megalin, a giant endocytic receptor abundantly expressed in renal proximal tubules, has been reported to bind aminoglycosides. Therefore we first examined whether megalin plays an important role in the renal accumulation of aminoglycosides under *in vivo* and *in vitro* conditions. We then attempted to develop new strategies for preventing the nephrotoxicity of aminoglycosides based on the molecular mechanisms of aminoglycoside accumulation in the kidney. This review summarizes our recent findings of the role of megalin in the renal accumulation of aminoglycosides and our approach to develop nonnephrotoxic aminoglycoside therapy.

Key words—aminoglycoside antibiotics; receptor-mediated endocytosis; nephrotoxicity; megalin; basic peptides

1. はじめに

ゲンタマイシン (GM) やアミカシン (AMK) に代表されるアミノグリコシド系抗生物質 (AGs) は、緑膿菌を含むグラム陰性菌に対し優れた抗菌活性を有し、世界的にみても重要な抗菌薬である。また最近では、AGs であるアルベカシンは数少ない MRSA 治療薬の 1 つとして臨床において重要な位置を占めている。しかし、AGs の投与によって、比較的高頻度に腎毒性や聴器毒性が惹起することが広く知られており、その警戒心から薬効が十分に期待できる場合においても、処方控ええられる場合が少なくない。AGs 投与によって誘発される腎毒性

は、その腎挙動と密接に関係していると考えられている。すなわち、生体内に投与された AGs は腎皮質に選択的かつ高濃度に移行し (投与量の約 10%)、またその蓄積が長期間に渡ることによって AGs の腎毒性が誘発されるものと考えられている。これまでの数多くの研究から、AGs の腎移行にはレセプター介在性エンドサイトーシスが関与することが示されてきた。また、そのレセプターとして生体膜脂質である酸性リン脂質の関与が示唆されていた。しかし、AGs が腎選択的に蓄積することを説明するには不十分であり、腎に特異的に存在するレセプターの関与が不可欠と考えられていたものの、長らく不明のままであった。近年、腎近位尿管上皮細胞の管腔側に高発現しているエンドサイトーシスレセプター・メガリン (Fig. 1) が、AGs と親和性を有することが報告された。¹⁻³⁾ これを契機として、筆者らは AGs の腎移行におけるメガリ

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

e-mail: jnagai@hiroshima-u.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

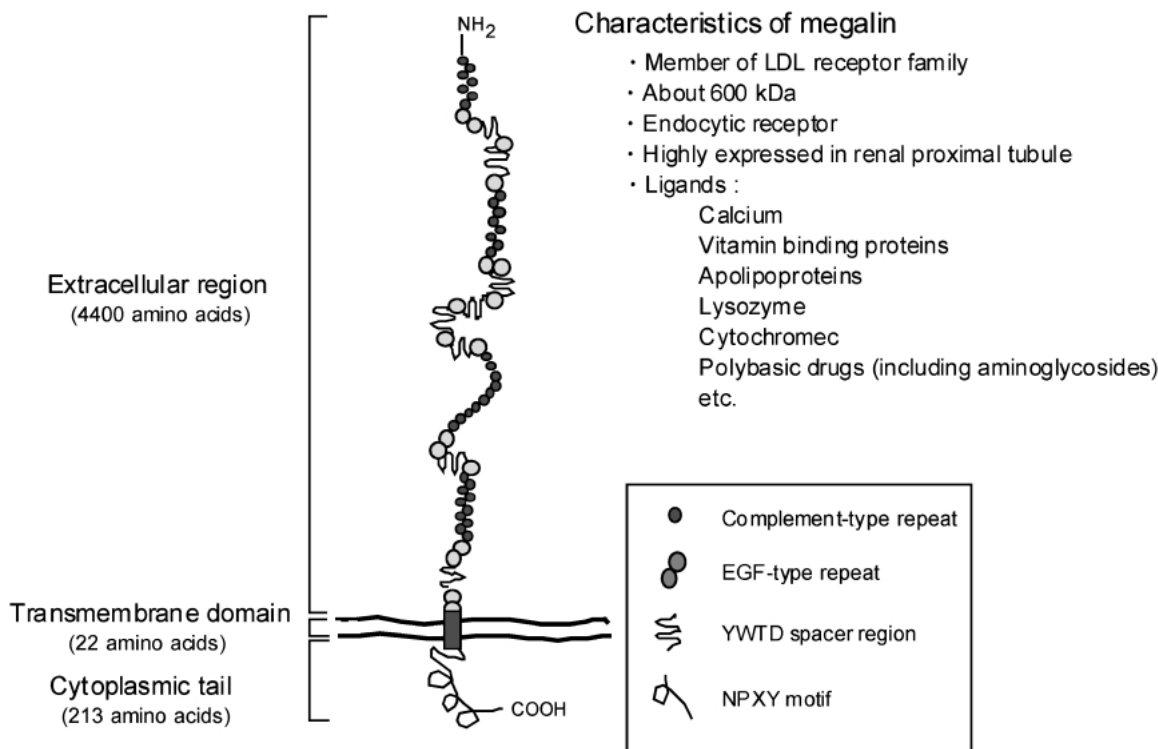


Fig. 1. Schematic Representation and Characteristics of Megalin, an Endocytic Receptor

ンの役割を明確にするため、ラットやマウスを用いた *in vivo* レベル及び培養腎上皮細胞や単離細胞膜などを用いた *in vitro* レベルでの解析を開始した。さらに、それらの解析によって得られた基礎的知見に基づき、AGs 腎取り込みに関与するレセプターを分子標的とした AGs の腎移行制御法の開発を進めている。⁴⁾ 本総説では、これらの研究によって得られた成果について紹介する。

2. AGs の腎移行におけるメガリンの関与^{5,6)}

AGs の体内動態におけるメガリンの関与を解析していく上で、メガリンの組織発現分布を調べることは不可欠である。しかし、その解析に必要なメガリンの抗体は市販されていなかったため、メガリン抗体を作製することから実験を開始した。メガリンは low-density lipoprotein (LDL) レセプターファミリーに属しており、その細胞外領域は同じ LDL レセプターファミリーのメンバーである LDL receptor-related protein (LRP-1) と高い相同性を示す。一方で、細胞内領域においては、LDL レセプターファミリーを含めクラスリン介在性のエンドサイトーシスレセプターに共通して存在する NPXY モチーフを除き、レセプター間の相同性は低い。そこで、メガリンの細胞内領域の部分ペプチドを抗原

として白色家兎に投与したところ、メガリンを特異的に認識する抗血清を得ることに成功した。この抗血清を用い、メガリンの組織発現分布を Western blotting によって解析したところ、メガリンの組織発現量は、腎皮質で最も高く、ついで腎髄質であり、脳、肺、肝では検出されなかった (Fig. 2 (A))。あわせて、静脈内投与した AMK の組織移行性について調べたところ、AMK の静脈内投与後 120 分における組織移行は、腎皮質、ついで腎髄質であり、腎乳頭、脳、肺、肝における移行は検出されなかった (Fig. 2 (B))。このように、メガリンの組織発現分布と AMK の組織移行性とが、良好な相関を示すことが観察された。

次に、ファンコニー症候群の実験モデルであるマレイン酸投与ラットにおいて、腎尿細管に発現しているメガリンが脱落することが報告されていたことから、⁷⁾ 筆者らはこのマレイン酸投与ラットが AGs の腎移行におけるメガリンの関与を解析する上で有用な動物モデルではないかと考え、これを用いてアミノグリコシドの腎移行解析を試みた。まず、メガリンがマレイン酸投与によって脱落することを確認するため、腎皮質と尿サンプルについて Western blotting を行った結果、マレイン酸投与によって腎

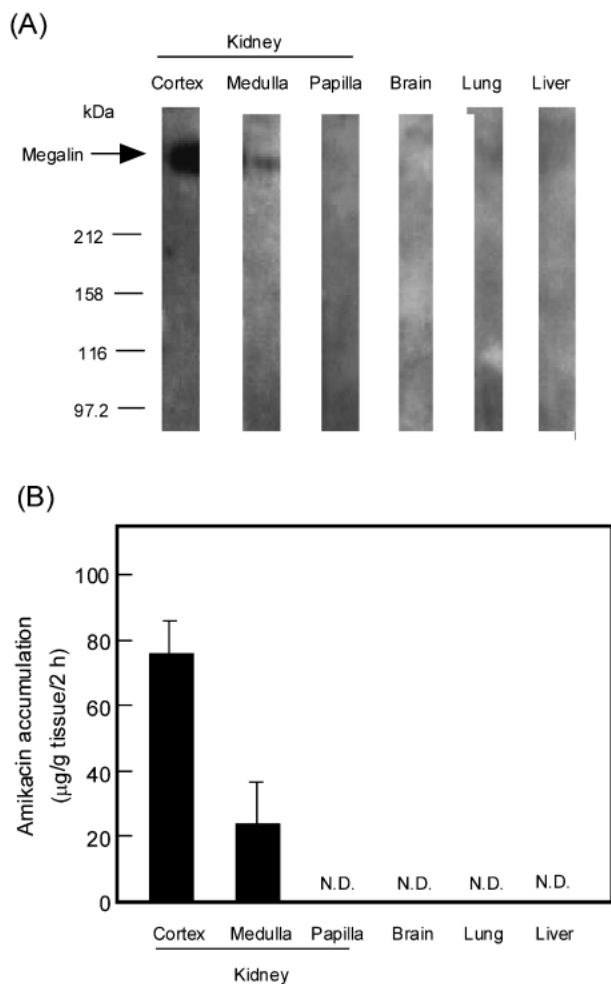


Fig. 2. Western Blot Analysis of Rat Tissue Homogenates with Anti-megalin Antiserum (A) and Tissue Distribution of Amikacin after Intravenous Administration to Rats (B) (from Ref. 5)
 Values are expressed as mean±S.E. of results from three to five rats. N.D.: not detected.

皮質のメガリンレベルが低下し、一方で、尿中にメガリンが出現してくることを認めた。そこで、マレイン酸投与後の様々な時間に AMK を投与し、腎皮質のメガリンレベルと AMK の腎皮質移行性について比較解析した。その結果、マレイン酸投与によって、速やかに腎皮質のメガリンレベルが低下するとともに、腎皮質への AMK 移行量も減少した。また、メガリンレベルの回復に伴って、AMK の腎皮質移行量も対照群と同程度にまで回復することが観察された (Fig. 3)。このように、腎皮質のメガリンレベルと AMK の腎皮質移行性が良好に対応することが示された。

メガリンの生理的な役割の 1 つとして、糸球体ろ過されたタンパク質の尿細管再取り込みが挙げられ

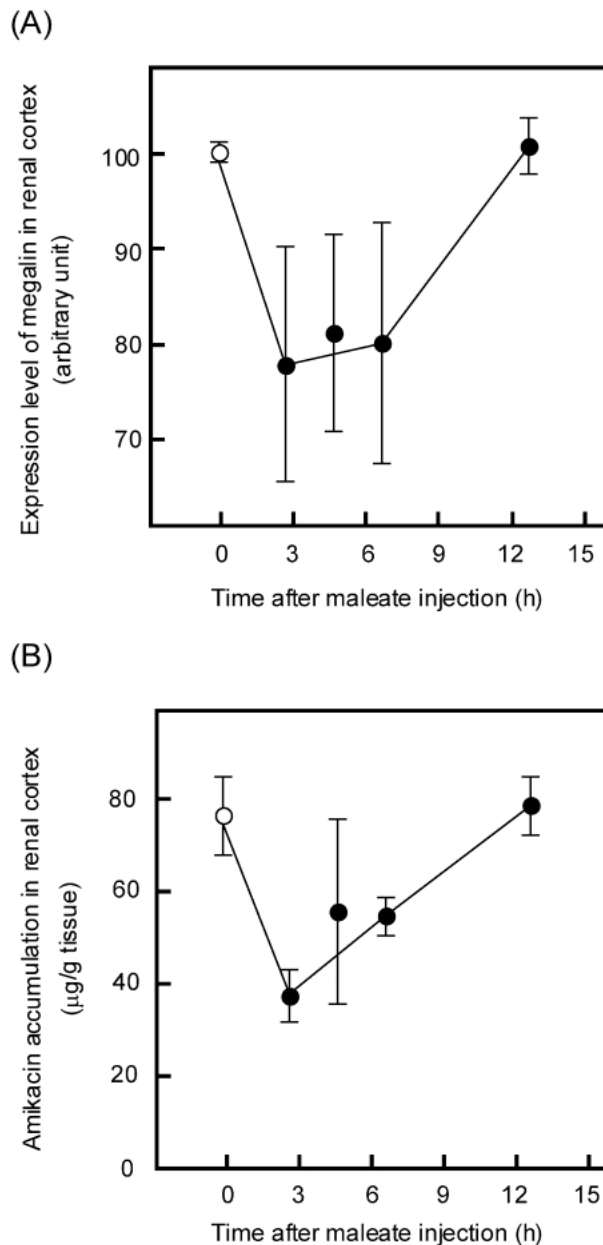


Fig. 3. Time Profile of Megalin Level and Amikacin Accumulation in Rat Renal Cortex after Maleate Injection (from Ref. 5)
 Open circle: normal rats, closed circle: maleate-treated rats. Values are expressed as mean±S.E. of results from three to five rats.

る。したがって、AGs がメガリンを介して尿細管に取り込まれるのであれば、AGs を投与することによって糸球体ろ過されたタンパク質の再取り込みが阻害されるものと考えられる。そこで、近位尿細管においてメガリンを介して取り込まれるビタミン D 結合タンパク質 (DBP)⁸⁾ の尿中排泄量に及ぼす GM 投与の影響について検討した。その結果、対照群に比べ、GM 投与群において DBP の尿中排泄が

上昇することが観察された (Fig. 4(A)). また, GM 持続注入時にメガリンのリガンドであるリゾチームの FITC 標識体を投与し, その尿中あるいは胆汁中排泄量を測定した. その結果, 対照群に比べ, GM 投与群における FITC-リゾチームの尿中排泄量は有意に増加したが (Fig. 4(B)), 胆汁中排泄量への影響は観察されなかった. これら DBP やリゾ

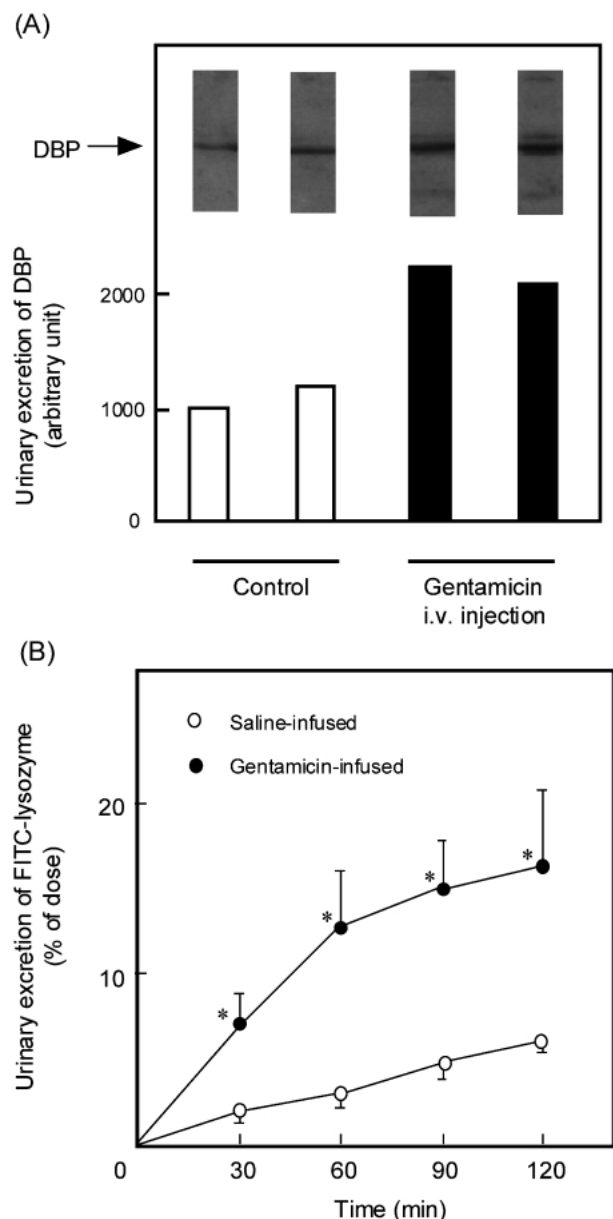


Fig. 4. Effect of Gentamicin on Urinary Excretion of Endogenous Vitamin D Binding Protein (DBP) (A) and Intravenously Injected FITC-lysozyme (B) (from Refs. 5 and 6)

(A) Values are expressed as optical density determined for each DBP band using NIH image software. (B) Open circle: saline-infused group, closed circle: gentamicin-infused group. Values are expressed as mean \pm S.E. of results from four or five rats. * $p < 0.05$, significantly different compared with the value for the saline-infused group.

チームを用いた実験から, GM は尿細管再取り込みにおいて, メガリンリガンドと競合するものと考えられた. また, Schmitz ら⁹⁾の報告によれば, メガリンをノックアウトしたマウスでは [^3H]GM の腎移行は投与量の 0.6%に過ぎず, 対照群の 10.6%に比べて, 著しく低いことが示されている. したがって, これらの *in vivo* を中心とした一連の解析結果から, AGs の腎蓄積にメガリンが重要な役割を果たしていることが明確となった. そこで次に, メガリンを分子標的とすることで AGs の腎移行を阻害し, ひいては腎毒性を防御できるか否かについて検討を進めた.

3. メガリンを分子標的とした AGs の腎移行・毒性防御¹⁰⁾

メガリンを分子標的としたストラテジーを模式的に示す (Fig. 5). すなわち, AGs とメガリンリガンドを併用投与することによって, メガリンへの結合を抑制することができれば, AGs は腎尿細管上皮細胞内に取り込まれることなく尿中に排泄され, 腎毒性を防御できるものと考えられる. そこで, [^3H]GM 投与時にチトクローム C, リゾチームやアプロチニンなどの各種メガリンリガンドを併用投与したところ, [^3H]GM の腎皮質移行が抑制されることが示された (Fig. 6(A)). さらに, 併用するチトクローム C の投与量を変化させたところ, 用量依存的に [^3H]GM の腎移行が低下することが観察された (Fig. 6(B)).

メガリンリガンドの併用投与によって GM の腎移行が低下することが示されたことから, 実際に GM によって誘発される腎毒性が軽減されるか否かを, 尿細管障害マーカーである *N*-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ (NAG) の尿中排泄量を指標に調べた. その結果, GM 投与によって上昇した尿中 NAG 排泄量は, チトクローム C の併用投与によって対照群と同程度にまで低下することが観察された (対照群 213.6 ± 25.5 , GM 単独投与群 324.1 ± 23.8 , GM/チトクローム C 併用群 229.7 ± 22.5 mU/day, $n=3$). したがって, メガリンリガンドを併用投与する手法によって, AGs の腎移行のみならず, 腎毒性も軽減できることが明らかになった.

しかし, 併用剤のヒトでの投与量を体重換算で求めると, AGs の腎移行を抑制するためには数グラムという高用量のチトクローム C を静脈内投与す

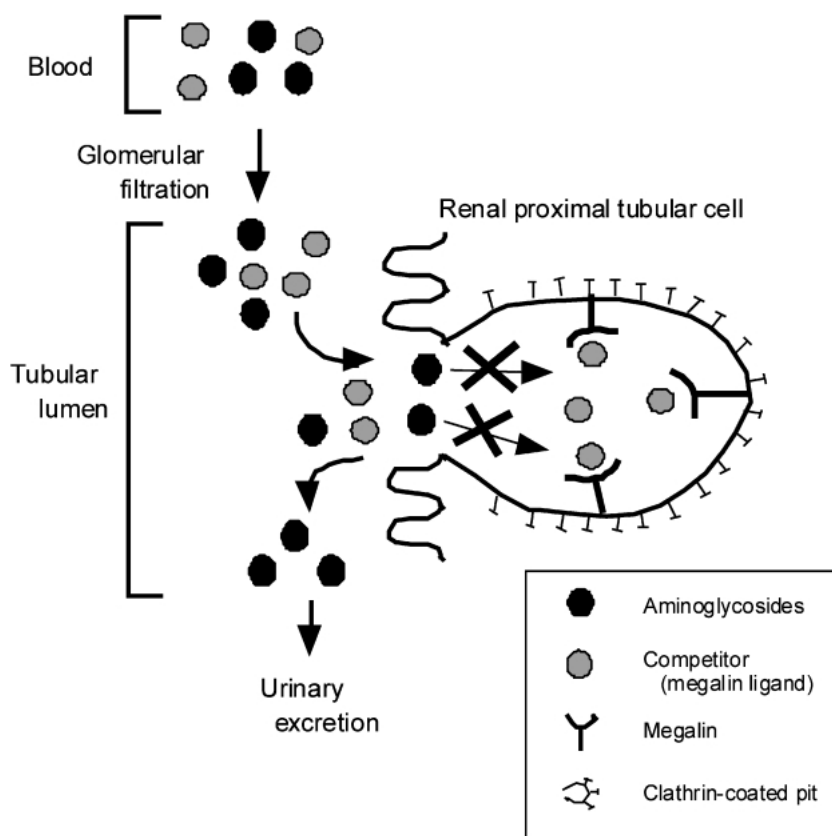


Fig. 5. A Scheme for Megalin-targeted Prevention of Renal Accumulation of Aminoglycosides by Coadministration of Megalin Ligands

る必要があることになる。これだけの高用量を投与することは臨床において難しいと考えられるため、併用剤の用量を下げるための研究へと展開した。筆者らはまず、チトクロームCのアミノ酸配列からメガリンとの相互作用に必要と予想される領域を選び出し、阻害効果を維持したまま分子量を下げることであれば、用量の低下に繋がるものと考えた。メガリンリガンドの多くは塩基性領域を有しており、その塩基性領域がメガリンの酸性アミノ酸に富む領域に結合することが示唆されている。そこで、チトクロームCのアミノ酸配列において塩基性アミノ酸に富む領域である、79番目から88番目の10アミノ酸からなるペプチドCyto79—88 (KMIFAGIKKK)を設計した。まず、メガリンが発現している培養腎上皮細胞OK¹¹⁾における³H]GMの細胞内取り込みに及ぼすCyto79—88の影響について調べた結果、チトクロームCによる濃度依存的な³H]GM取り込みの阻害効果に比べて、Cyto79—88による阻害効果は左にシフトし、より低濃度で³H]GM取り込みを阻害することが観察された (Fig. 7

(A))。そこで、*in vitro*で観察されたペプチドフラグメント化による阻害効果の増強が、*in vivo*でも認められるかどうかについて検討した。しかし、*in vivo*の場合には、チトクロームCで十分に³H]GMの腎移行阻害効果が観察される用量においても、Cyto79—88による効果は観察されなかった (Fig. 7 (B))。そこで、*in vivo*においても効果を発揮できるペプチドについてさらなる探索を進めた。

4. 塩基性ペプチドN-WASP181—200及びその改変ペプチドによるAGs腎移行阻害効果^{10,12)}

N-WASP181—200は、neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)と呼ばれるアクチン調節タンパク質の181から200番目のペプチドである (Table 1)。このペプチドに着目した理由は、N-WASP181—200がメガリンとの相互作用に重要な要因である塩基性のペプチドであることに加え、古くからアミノグリコシドの腎取り込みレセプターであることが指摘されている酸性リン脂質と結合することから、¹³⁾より強力なAGsの腎移行阻害効果を期待できると考えたためである。

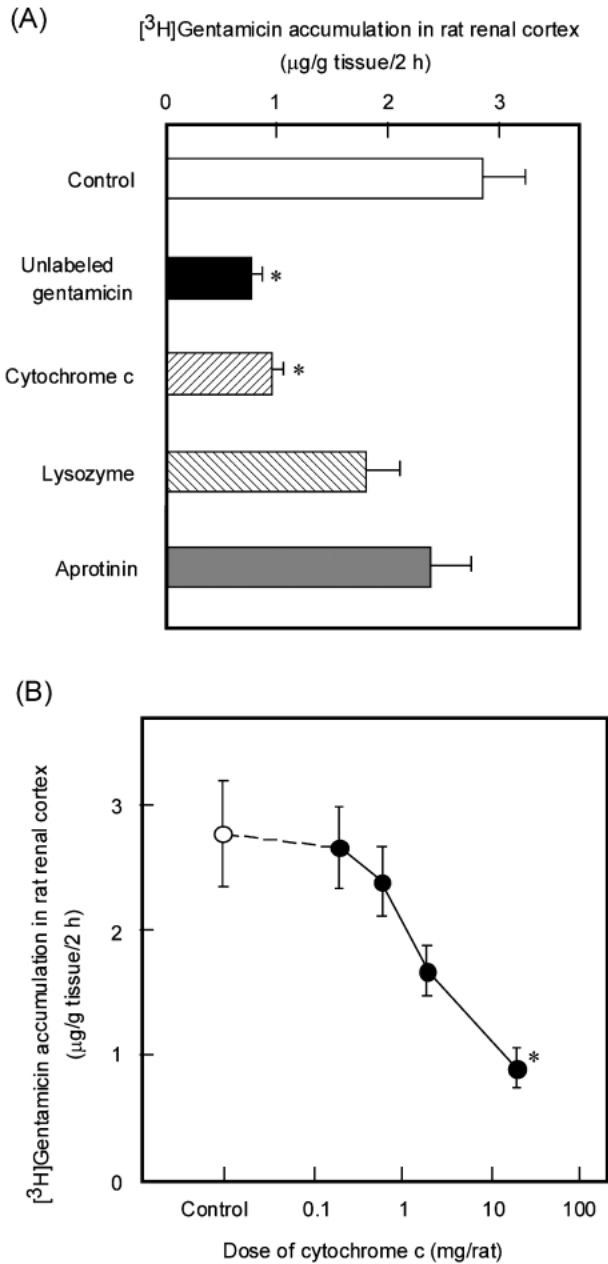


Fig. 6. Effects of Coadministration of Various Megalin Ligands (A) and Dose-dependent Effect of Cytochrome c (B) on [3H]Gentamicin Accumulation in Rat Renal Cortex (from Ref. 10)
 Values are expressed as mean ± S.E. of results from three rats. **p* < 0.05, significantly different compared with the value for control.

まず、N-WASP181—200 による [3H]GM 腎移行阻害効果について、*in vitro* と *in vivo* で評価した。その結果、N-WASP181—200 は、培養腎上皮細胞 OK における [3H]GM の取り込みを濃度依存的に阻害し、その阻害効果は、それまでに使用した併用物質の中で最も強いものであった (Fig. 8 (A))。また、N-WASP181—200 は *in vivo* におい

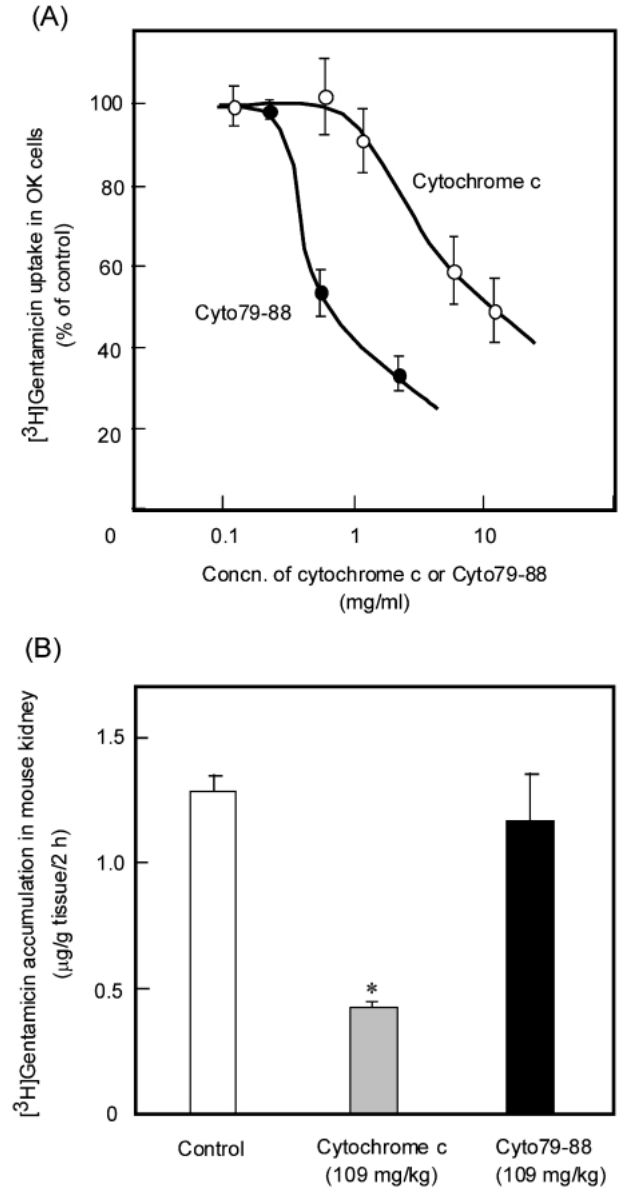


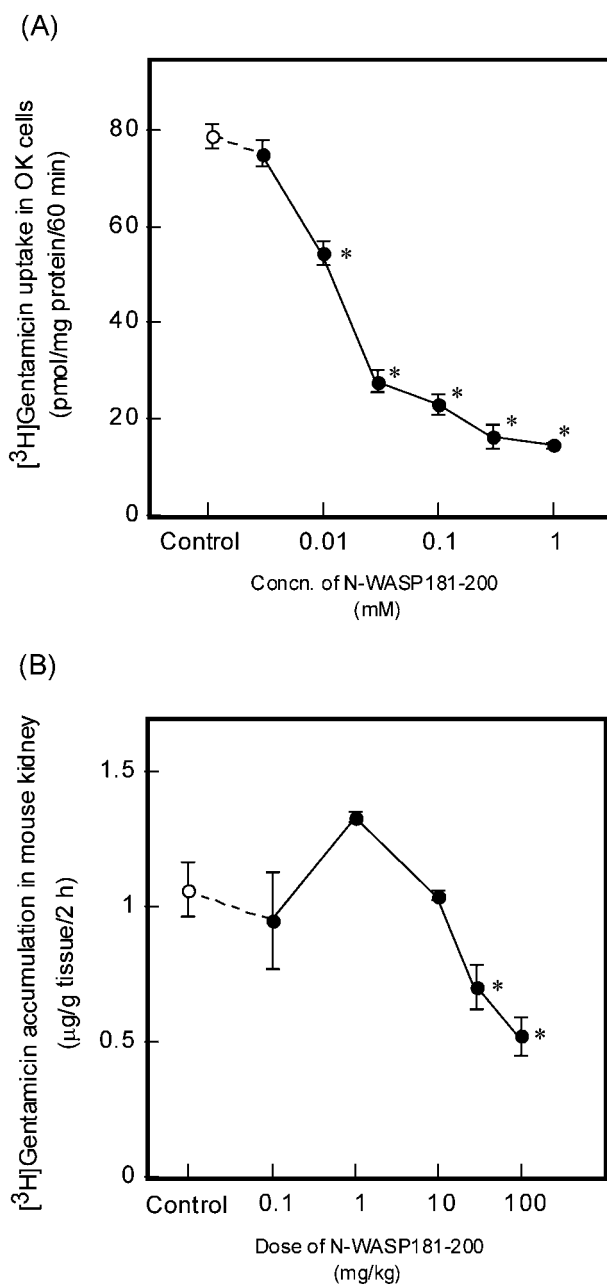
Fig. 7. Effects of Cytochrome c and Its Fragment Peptide Cyto79—88 on [3H]Gentamicin Uptake in OK Kidney Epithelial Cells Expressing Megalin (A) and Renal Accumulation in Mice (B) (from Ref. 10)
 (A) Values are expressed as mean ± S.E. of results from three monolayers. (B) Values are expressed as mean ± S.E. of results from three mice. **p* < 0.05, significantly different compared with the value for control.

ても、[3H]GM の腎移行を投与量依存的に阻害することが観察された (Fig. 8(B))。

次に、N-WASP181—200 の効果をさらに高めることを目的として、その配列に含まれるアミノ酸に着目した。メガリンを含む LDL レセプターファミリーのメンバーに共通して存在する ligand binding repeat と呼ばれる領域には、Ser-Asp-Glu からなる SDE モチーフが繰り返して存在し、この SDE モ

Table 1. Sequences, Net Charges, IC₅₀ Values for [³H] Gentamicin Binding to Rat Renal Brush-border Membrane and Ellipticities at 222 nm of N-WASP181—200 and Its Mutant Peptides (from Ref. 12)

Peptide	Sequence	Net charge	IC ₅₀ value (mM)	Ellipticity at 222 nm (deg·cm ² ·dmol ⁻¹)
N-WASP181—200	NISHTKEKKKKGAKKKRLTK	+10	0.041±0.0001	4.34×10 ³
N-W (K9G, K15G)	NISHTKEKGGKAKGKRLTK	+8	0.078±0.009	1.77×10 ³
N-W (K9E, K15E)	NISHTKEKEKGAKEKRLTK	+6	0.043±0.009	3.47×10 ³
N-W (E7K)	NISHTKKKKKKGAKKKRLTK	+12	0.034±0.003	4.74×10 ³

Fig. 8. Effect of N-WASP181—200 on [³H]Gentamicin Uptake in OK Cells (A) and Renal Accumulation in Mice (B) (from Ref. 10)

(A) Values are expressed as mean±S.E. of results from three monolayers. **p*<0.05, significantly different compared with the value for control. (B) Values are expressed as mean±S.E. of results from three mice. **p*<0.05, significantly different compared with the value for control.

チーフによって形成される酸性領域がリガンドの塩基性領域との相互作用に重要であると考えられている。N-WASP181—200のアミノ酸配列中には、塩基性アミノ酸が3個以上連続する配列が2カ所存在する。そこで、筆者らはこの塩基性アミノ酸からなるクラスターがメガリンのSDEモチーフとの相互作用、ひいてはAGsの腎移行阻害に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。この点について精査するため、Table 1に示す3種の改変ペプチドをデザインした。N-W (K9G, K15G)は7番目と15番目の塩基性アミノ酸Lysを中性アミノ酸Glyに置換したものの、N-W (K9E, K15E)は同部位を酸性アミノ酸であるGluに置換したものであり、さらにN-WASP181—200に比べより塩基性を高めるために、配列内唯一の酸性アミノ酸である7番目のGluをLysに置換したN-W (E7K)を合成した。

[³H]GMの腎刷子縁膜結合に及ぼす3種の改変ペプチドの影響について、親ペプチドであるN-WASP181—200と比較したところ、いずれの改変ペプチドによっても濃度依存的な阻害効果が観察された。Hill式を用いて算出した各ペプチドのIC₅₀値をTable 1に示す。その結果、Gly置換したN-W (K9G, K15G)のIC₅₀値はN-WASP181—200に比べて上昇し、阻害効果の低下が観察された。一方、N-W (E7K)のIC₅₀値はN-WASP181—200に比べて低下し、ペプチドの塩基性を高めることによって[³H]GM結合に対する阻害効果が強まることが観察された。その一方で、2つの塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換したN-W (K9E, K15E)では、予想に反して、IC₅₀値の変化はほとんど観察されなかった。したがって、ペプチドの塩基性アミノ酸数から酸性アミノ酸数を差し引いたnet chargeの違いだけでは、IC₅₀値の変化は説明できないものと考えられた。

そこで、筆者らはペプチドの二次構造が[³H]

GM 結合阻害効果に関与しているのではないかと想定し、各ペプチドの高次構造について解析を進めた。まず、各ペプチドについて、二次構造予測サーバ (PredictProtein server) を用いて構造予測を行ったところ、親ペプチドである N-WASP181—200, N-W (K9E, K15E), N-W (E7K) では α -ヘリックス構造を有するが、阻害効果の低下を示した N-W (K9G, K15G) のみが α -ヘリックスを形成しないものと推定された。そこで、実際に各ペプチドの二次構造についての情報を得るため、円二色性 (CD) スペクトルを測定した。その結果、N-WASP181—200 の CD スペクトルは、222 nm 付近に極小値を示す α -ヘリックス構造に特徴的なパターンを示した。各ペプチドについて、 α -ヘリックス含量の指標とされる 222 nm における楕円率 $[\theta]$ を算出した結果を Table 1 に示す。その結果、 ^3H GM 結合阻害効果が低下した N-W (K9G, K15G) の α -ヘリックス含量は、他の 3 種のペプチドに比べて低いことが示された。また、各ペプチドの 222 nm における楕円率 $[\theta]$ と IC_{50} 値との相関関係を調べたところ、有意に相関のある直線関係が得られた ($r=0.96, p<0.05$)。これらの結果から、より強力な AGs 腎移行阻害効果を発揮させるためには、ペプチドが α -ヘリックス構造を有することが不可欠であることが示唆された。興味あることに、メガリンリガンドでもあるアポリポプロテイン E (apo-E) と LDL レセプターとの結合において、apo-E の塩基性に富む receptor binding domain が α -ヘリックス構造を形成することが、両者の相互作用に重要であることが示唆されている。¹⁴⁾ このように、ペプチドの二次構造も考慮することで、より AGs 腎移行阻害活性の高いペプチドを設計できるものと考えられる。

5. おわりに

最初の AGs であるストレプトマイシンが発見されて以来 60 年以上が経つが、現在でも AGs は感染症治療に不可欠な抗菌薬である。しかし、有効血中濃度域の幅が狭く、臨床において TDM (therapeutic drug monitoring) の対象となる薬物である。これまでに数多くなされてきた AGs の抗菌作用や体内動態に関する研究から、AGs の 1 日 1 回投与方法 (once-daily dosing) が、分割投与方法に比べ、有効性、安全性及び経済性などにおいて優れているとさ

れている。一方、AGs の腎毒性をより確実に防御するためには、AGs の腎移行を完全に阻害することが最も確かな手段であるものと考えられる。本研究では、AGs の腎移行の分子機構について解析を進め、その分子機構に基づき AGs の腎移行及び腎毒性を防御するためのドラッグデリバリーシステムの開発に取り組んできた。また、本研究の成果に基づき、AGs 腎毒性防御剤としての有用性が期待できる N-WASP181—200 関連ペプチドについて特許化を進めている (特開 2003—261459, 特願 2005—016132)。しかし、こうした研究成果を実用化にまで到達させるためには、それらペプチドの安全性など、検討すべき課題が数多く残されている。特に、動物実験から予想すると、AGs の腎移行阻害効果を発揮するためにヒトにおいて必要とされる併用剤の用量は、これらペプチドでも数百ミリグラム以上と見積もられ、その用量を低減させるためのさらなる研究が不可欠である。今後、ペプチドの体内動態を制御することで腎指向性を高めていくことなどを目的とした *in vivo* 研究とともに、より低濃度で AGs 腎移行阻害効果を発揮するペプチドを設計していくための *in vitro* 研究を進め、両者のバランスに優れたペプチドあるいはその誘導体を開発していきたいと考えている。

謝辞 本研究は広島大学大学院医歯薬学総合研究科医療薬剤学研究室、高野幹久教授のご指導の下で行ったものであり、この場を借りて心から感謝申し上げます。また、貴重なご助言を賜りました広島国際大学薬学部、村上照夫教授に厚くお礼申し上げます。さらに、多大なご協力を頂きました広島大学大学院医歯薬学総合研究科医療薬剤学研究室湯元良子博士をはじめ、卒業生及び在学生の皆様に深謝致します。

REFERENCES

- 1) Saito A., Pietromonaco S., Loo A. K., Farquhar M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9725–9729 (1994).
- 2) Christensen E. I., Birn H., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 256–266 (2002).
- 3) Moestrup S. K., Cui S., Vorum H., Bregengård C., Bjørn S. E., Norris K., Gliemann J., Christensen E. I., *J. Clin. Invest.*,

- 96, 1404–1413 (1995).
- 4) Nagai J., Takano M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 159–170 (2004).
 - 5) Nagai J., Tanaka H., Nakanishi N., Murakami T., Takano M., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **281**, F337–F344 (2001).
 - 6) Nagai J., Katsube T., Murakami T., Takano M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1491–1496 (2002).
 - 7) Bergeron M., Mayers P., Brown D., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **271**, F908–F916 (1996).
 - 8) Nykjaer A., Dragun D., Walther D., Vorum H., Jacobsen C., Herz J., Melsen F., Christensen E. I., Willnow T. E., *Cell*, **96**, 507–515 (1999).
 - 9) Schmitz C., Hilpert J., Jacobsen C., Boensch C., Christensen E. I., Luft F. C., Willnow T. E., *J. Biol. Chem.*, **277**, 618–622 (2002).
 - 10) Watanabe A., Nagai J., Adachi Y., Katsube T., Kitahara Y., Murakami T., Takano M., *J. Control. Release*, **95**, 423–433 (2004).
 - 11) Takano M., Nakanishi N., Kitahara Y., Sasaki Y., Murakami T., Nagai J., *Kidney Int.*, **62**, 1707–1717 (2002).
 - 12) Nagai J., Saito M., Adachi Y., Yumoto R., Takano M., *J. Control. Release*, (2006) (in press).
 - 13) Prehoda K. E., Scott J. A., Mullins R. D., Lim W. A., *Science*, **290**, 801–806 (2000).
 - 14) Mahley R. W., *Science*, **240**, 622–630 (1988).