

ヨード造影剤による腎障害発現機序の解明とベラプロストの保護作用

矢野 貴久

The Etiology of Iodinated Radiocontrast Nephrotoxicity and Its Attenuation by Beraprost

Takahisa YANO

Department of Pharmacy, Kyushu University Hospital, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received March 13, 2008)

Radiocontrast nephropathy (RCN) is a major complication after radiographical examination with iodinated contrast media (CM). Although little is known about the mechanism of RCN, a direct toxic action on renal cells and/or decrease in renal blood flow are considered to be implicated in the pathogenesis of the disease/the condition. A large number of vasodilatory agents, including endothelin antagonists, adenosine antagonists, atrial natriuretic peptide, calcium channel blockers, dopamine, dopamine D1 receptor agonist fenoldopam, and prostaglandin E1 have been tried clinically to prevent RCN, however, most of them have failed. Although prophylactic effects of antioxidant N-acetylcysteine have recently been reported by several investigators, only hydration is a universally accepted protocol to prevent it. In our recent *in vitro* and *in vivo* study, we have elucidated that CM induced apoptosis of renal tubular cells through the reduction in Bcl-2 expression and the subsequent activation of caspase-9 and caspase-3. Moreover, we found that CM caused an increase in ceramide content in renal tubular cells, which leads to apoptosis by inhibiting the phosphorylation of Akt and cAMP responsive element binding protein (CREB) and the subsequent reduction in Bcl-2 expression. The inhibitor of ceramide synthase, fumonisins B1, reversed both the elevation of ceramide content and renal cell injury induced by CM. On the other hand, a prostacyclin analog beraprost prevented RCN in mice by the increase of endogenous cAMP and subsequent CREB phosphorylation resulted in enhancement of Bcl-2 expression. These findings suggest that ceramide synthesis inhibitor or beraprost is potentially useful for the prophylaxis of RCN.

Key words—radiographic contrast media; nephrotoxicity; beraprost; cAMP; ceramide; apoptosis

1. はじめに

1-1. 造影剤腎症について ヨード造影剤（以下、造影剤）は X 線の吸収を高める優れた陽性造影剤であり、X 線造影技術の発展とともに近年、その使用は増加の一途を辿っている。1950 年代から 60 年代にかけては、イオン性の造影剤が数多く開発されたが、蕁麻疹や紅斑などの過敏症状が高頻度で発現し、さらに、ときとして呼吸困難や肺浮腫、血圧低下、意識消失、心停止といった重篤なショック症状を引き起こすことが大きな問題となった。その後 1980 年代になり、非イオン性の造影剤

が次々と開発され、アナフィラキシー様の副作用発現は大幅に減少した。

一方、これらの過敏反応に加えて造影剤投与患者で特に注意しなければならないのは急性腎不全の発症である。造影剤の投与によって起こる腎障害は造影剤腎症と呼ばれ、特に、高齢者や腎機能が低下している患者、又は抗腫瘍薬や抗菌薬、解熱鎮痛薬などを使用している患者においてはその発症頻度が非常に高く、代表的な薬剤性腎障害の 1 つとされている。米国 FDA (Food and Drug Administration) により報告された 1990–1994 年の副作用報告によると、非イオン性造影剤による腎症の発症頻度は 2.3% であった。¹⁾ 一方、Porter (1994) によると、造影剤腎症の発症率は全体では 2–7% 程度であるが、血清クレアチニン (SCr) 値が 1.5 mg/dl 以上の患者における発症率は、5–10 倍高いことが報告され

九州大学病院薬剤部 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

e-mail: tyano@pharm.med.kyushu-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ている。²⁾ さらに、Mehran *et al.* (2004) は、造影剤腎症発症のリスクファクターとして、1) 低血圧、2) 大動脈内バルーンポンプによる循環補助、3) うっ血性心不全、4) 高齢 (75 歳以上)、5) 貧血、6) 造影剤投与量、7) 腎機能低下の有無を挙げ、それらを用いたスコアにより、腎症のリスクが 7.5–57.3 % まで異なると報告している。³⁾ 造影剤腎症の定義は一般的に「造影剤投与 3 日以内に血清クレアチニン値が 0.5 mg/dl 以上若しくは 25% 以上増加すること」と言われており、⁴⁾ 通常 1 週間程度で回復する可逆的な機能障害である。しかしながら、ときとして不可逆的な腎不全に陥るケースもあり、Rihal *et al.* (2002) の報告によると、冠動脈造影検査を施行された 7586 人の患者中、254 人 (3.3%) に腎症が発症し、そのうち 20 人 (7.9%) に透析が導入されている。⁵⁾ すなわち造影剤腎症の発症は、患者の QOL (Quality of Life) を低下するだけでなく、入院延長に伴う医療費増大という医療経済面においても重大な問題である。

1-2. 造影剤腎症の予防策について：N-アセチルシステインは有効か？ 造影剤腎症の発現機序には、造影剤投与による腎血管の収縮や腎血流量の低下、糸球体濾過量の低下といった血管性の要因の関与が示唆されてきた。⁶⁻⁸⁾ しかしながら、ドパミンやカルシウムチャネルブロッカー、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、エンドセリンアンタゴニストや、テオフィリンといった腎血流改善薬を用いての造影剤腎症予防の臨床研究はいずれも、有効性を証明するには至っていない。⁹⁾

また最近、造影剤腎症に対する N-アセチルシステインの保護効果が報告され、¹⁰⁾ 多くの臨床試験やメタ解析が行われてきたが、その効果は有意差が付くボーダーライン近くにあり、明確な結論を引き出すには至っていない。¹¹⁻¹⁴⁾ 2000 年から 2006 年までの 29 の臨床試験結果をまとめた Stenstrom *et al.* (2008) は、高用量の N-アセチルシステインは造影剤腎症に有効であるかもしれないが、非常に高用量を用いる必要があることから、投与経路やアナフィラキシーへの対応といった、さらなる予備検討が必要であり、第 3 相試験は時期尚早であるとの見解を示している。¹⁵⁾ したがって、造影剤腎症の予防法として現在臨床で認められているのは、依然として、排泄促進を目指した輸液療法のみである。

一方、造影剤は、腎尿細管細胞に対する直接的な細胞毒性を示すことも報告されている。¹⁶⁻¹⁹⁾ そこで本研究では、造影剤による腎尿細管細胞障害に着目し、ブタ近位尿細管由来細胞 (LLC-PK1 細胞) 及びマウスを用いた造影剤腎症モデルにより、造影剤腎症の発現機序並びに保護薬物候補を明らかにした。

2. 造影剤による腎尿細管細胞のアポトーシスとその発現機序

種々のイオン性 (イオタラム酸、アミドトリゾ酸、イオキサグル酸) 並びに非イオン性造影剤 (イオヘキソール、イオベルソール、イオメプロール、イオパミドール、イオトロラン) を 30 分間 LLC-PK1 細胞に曝露すると、24 時間後には細胞障害が引き起こされた。²⁰⁾ 一方で、造影剤の浸透圧と、細胞生存率低下作用との間には、有意な相関は認められず、非イオン性造影剤イオベルソールは、浸透圧を一定にした条件下においても LLC-PK1 細胞に対して濃度依存的な細胞生存率の減少を引き起こした [Fig. 1(A)]. 造影剤曝露により、アポトーシス初期に細胞膜内部から外部に移行するホスファチジルセリンを特異的に染める Annexin V 染色や、断片化 DNA を特異的に染める TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 染色に陽性を示す細胞が顕著に増加したこと [Fig. 1(B)], 及び DNA の断片化が認められたことから、²⁰⁾ この LLC-PK1 細胞障害はアポトーシスによるものであると考えられた。また、造影剤による DNA 断片化は、非特異的なカスパーゼ阻害剤、カスパーゼ 3 阻害剤及びカスパーゼ 9 阻害剤の前処置によって消失したが、カスパーゼ 8 阻害剤では影響されなかった。²⁰⁾ 実際にカスパーゼ活性を測定すると造影剤曝露により、カスパーゼ 3 及びカスパーゼ 9 の活性が顕著に上昇した [Fig. 1(C)]. さらに、造影剤曝露によりアポトーシス促進因子である Bax 発現が増加し、一方でアポトーシス抑制因子である Bcl-2 発現が減少した [Fig. 1(D)].

一方、左腎の腎動脈、腎静脈、尿管を結紮したマウスに造影剤を静脈内投与することで、*in vivo* 造影剤腎症モデルを作製した。²¹⁾ 片腎結紮マウスにイオベルソール (4 g ヨード/kg) を投与すると、24 時間後に腎尿細管細胞障害の指標である尿中 NAG (*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase) 活性の顕著な上昇が認められた [Fig. 2(A)]. この時の腎切片を

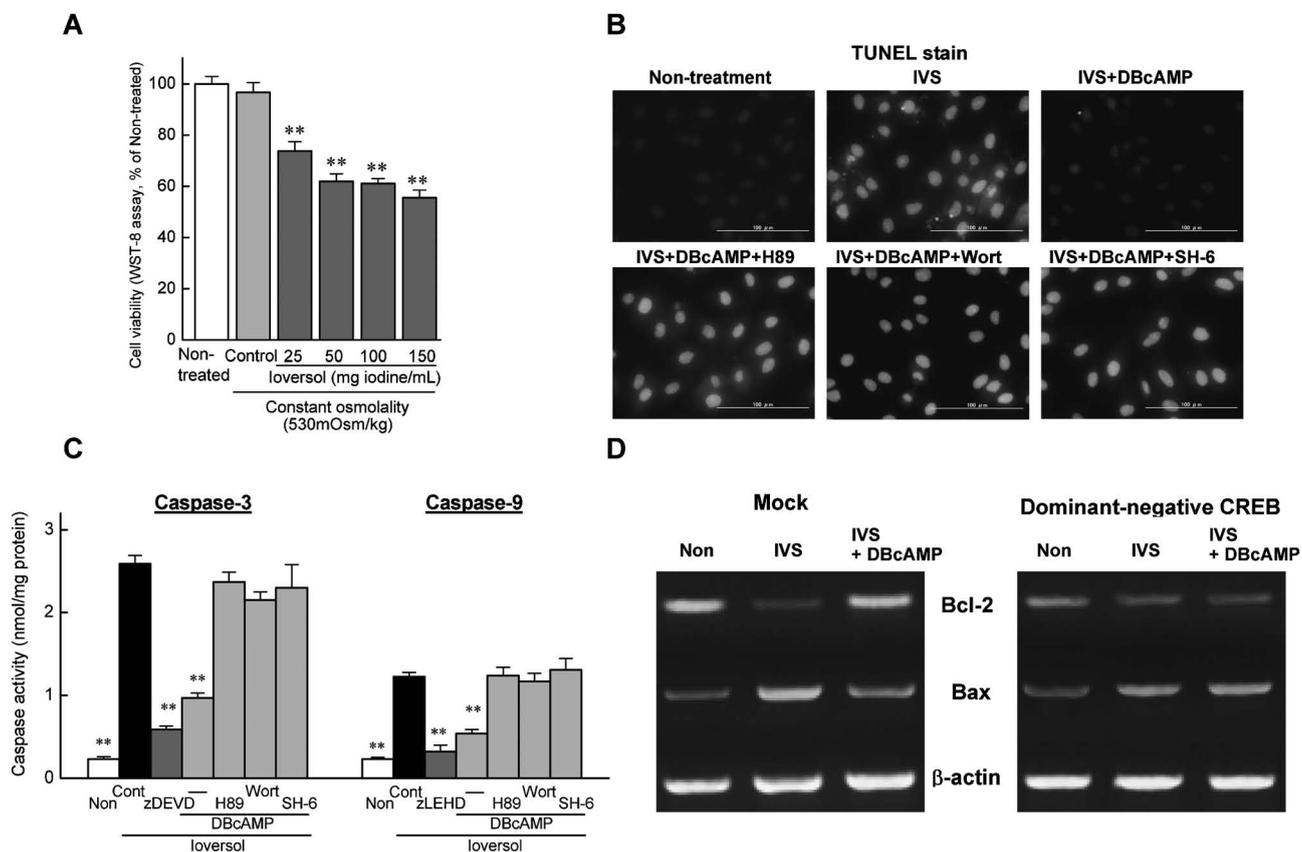


Fig. 1. Protective Effect of Dibutyryl cAMP (DBcAMP) against Non-ionic Contrast Media Ioversol-induced Apoptotic Injury in a Renal Tubular Cell Line LLC-PK1 Cells
 ***p*<0.01 vs. control.

TUNEL 染色すると、尿細管や間質細胞に多くの TUNEL 陽性細胞が観察され [Fig. 2(B)], さらに、造影剤投与群の腎組織では、bcl-2 mRNA の低下並びに bax mRNA の増加が認められたほか [Fig. 2(D)], カスパーゼ 3 活性も顕著に上昇しており [Fig. 2(C)], *in vitro* モデルと同様の細胞死シグナルの活性化により、マウスに造影剤腎症が引き起こされたことが分かった。²¹⁾

3. 造影剤による腎障害に対するベラプロストの保護効果

アポトーシス抑制因子である Bcl-2 遺伝子の転写調節領域には cAMP-responsive element (CRE) と呼ばれる部位が存在し、この部位に CRE 結合タンパク (CREB) が結合すると Bcl-2 発現量が増加する。²²⁾ CREB は通常、細胞質に存在するが、リン酸化されると核内に移行し CRE に結合する。この CREB リン酸化に参与する細胞内シグナルの 1 つとして cAMP/プロテインキナーゼ A 系が知られている。²³⁾ そこで筆者らは、細胞内 cAMP を増加

させることにより、造影剤による腎細胞のアポトーシスが抑制されるであろうと考え、イオベルソール誘発細胞障害に対する非水解性 cAMP アナログのジブチリル cAMP (DBcAMP)、ホスフォジエステラーゼ阻害剤、及びプロスタサイクリンアナログのベラプロストの作用について調べた。その結果、いずれの薬物も造影剤による LLC-PK1 細胞障害を顕著に抑制することが明らかとなった。^{20,24)} ベラプロストによる細胞保護作用と細胞内 cAMP 濃度の上昇とは濃度的によく一致していたほか、DBcAMP やベラプロストにより尿細管細胞において顕著な CREB リン酸化が認められ、^{21,24)} さらに、dominant-negative CREB を導入した細胞においては DBcAMP による保護作用が消失したことから [Fig. 1(D)], 尿細管細胞における cAMP/プロテインキナーゼ A/CREB 系の活性化が造影剤腎症の予防に有効であろうことが考えられた。実際、造影剤腎症モデルマウスでの検討において、ベラプロスト (0.1-0.3 mg/kg) は、造影剤による腎障害を用量依存的に抑

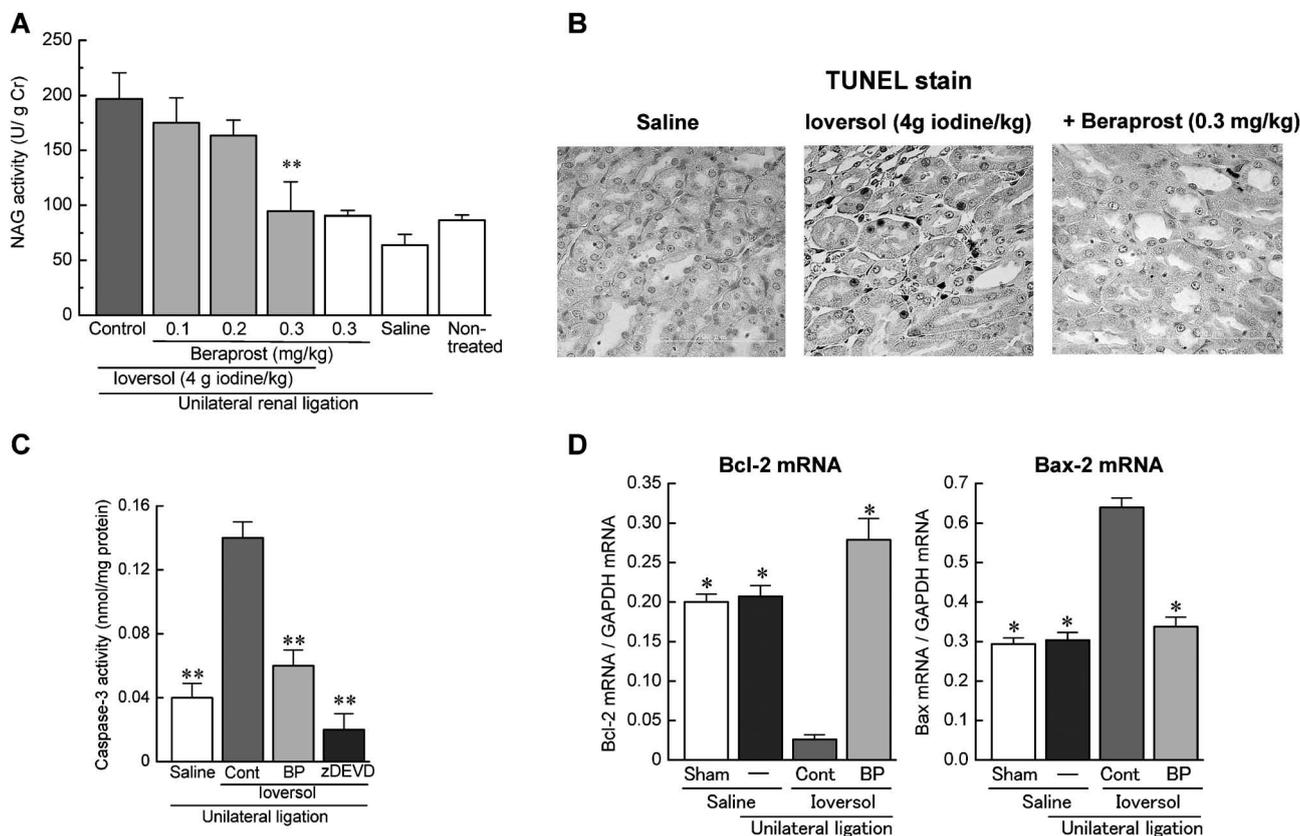


Fig. 2. Protective Effect of Beraprost in the *In vivo* Model of Radiocontrast Nephropathy in Mice

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

制し,²¹⁾特に 0.3 mg/kg の用量における保護効果は、ほぼ完全であった (Fig. 2)。

ベラプロストは、G タンパク質共役型のプロスタサイクリン受容体 (IP 受容体) を刺激し、促進性 G タンパク (Gs) を介して cAMP 産生を促進する。²⁵⁾ヒトの腎臓には IP 受容体が多く存在し、特に糸球体、血管内皮細胞、遠位尿管、集合管に多い。²⁶⁾プロスタサイクリンの腎保護作用については、糖尿病モデルラット²⁷⁾や、イヌにおける一過性虚血に基づく腎障害モデル²⁸⁾で既に証明されている。さらに、ラット近位尿管培養上皮細胞において、低酸素/グルコース除去による細胞障害がプロスタサイクリンにより抑制されることも報告されている。²⁹⁾一方、プロスタサイクリンを静脈内に投与すると腎血管の拡張、腎血流量の増加が引き起こされることから、³⁰⁾ベラプロストによるマウス造影剤腎症モデルでの腎保護作用に腎血流量増加作用も寄与しているのかもしれない。ベラプロストは慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛及び冷感の改善、原発性肺高血圧症に保険適用を有する医薬品であり、稀に

頭痛、顔面潮紅、ほてり等の副作用が出ることもあるが、重篤な副作用はほとんどない。すなわち、ベラプロストが造影剤腎症に対する有効な予防薬になり得る可能性が考えられた。

4. 造影剤による腎障害発現におけるセラミドの関与

一方、筆者らのごく最近の研究から、プロテインキナーゼ A から CREB リン酸化に至る経路に、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/Akt の経路が関与することが明らかとなった。³¹⁾さらに、造影剤がスフィンゴ脂質であるセラミドの *de novo* 合成を活性化し、Akt のリン酸化を抑制することで、腎細胞にアポトーシスを引き起こす可能性が示唆された。³¹⁾加えて、セラミド合成酵素阻害剤であるフモニシン B1 は、イオバルソールによる LLC-PK1 細胞のセラミド合成を抑制し [Fig. 3 (A)], マウスにおける造影剤腎症に対しても顕著に改善した [Fig. 3 (B)]. フモニシン B1 はカビ毒であることから、造影剤腎症の予防薬としての臨床応用は不可能であるが、これらの結果は、セラミドの増加が造影

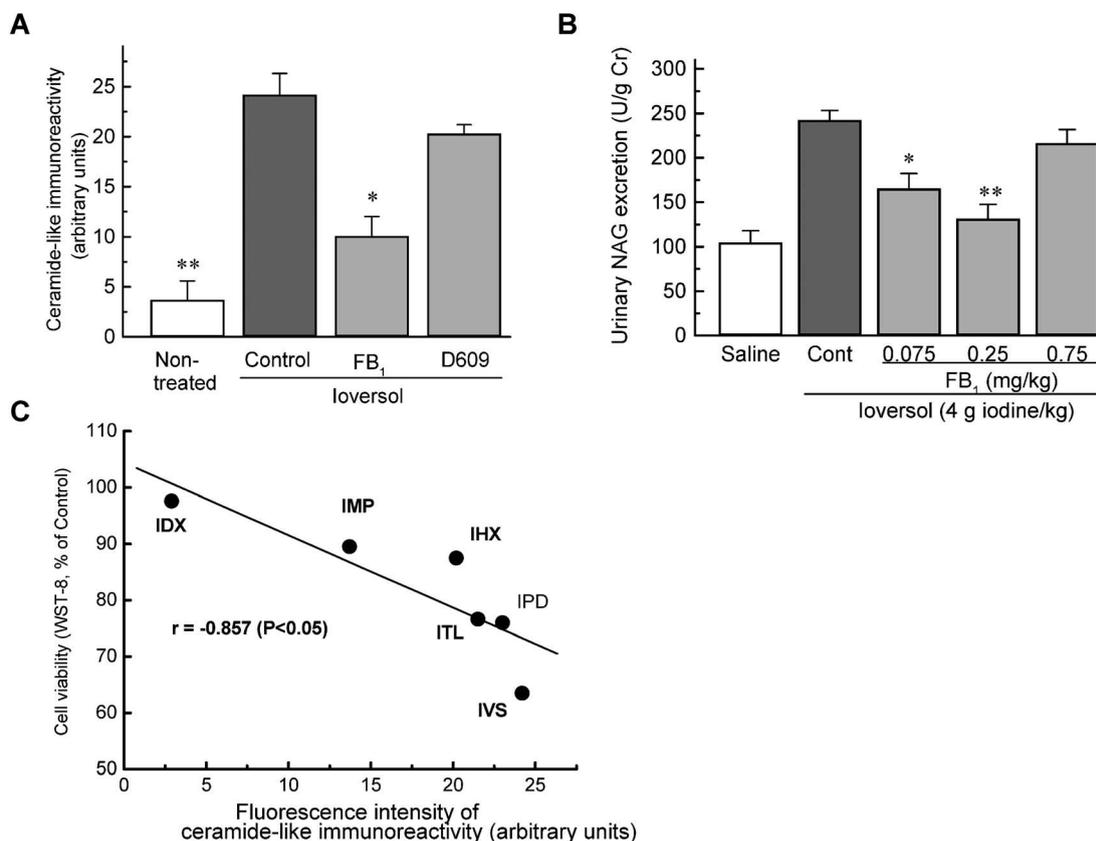


Fig. 3. Involvement of *De novo* Ceramide Synthesis in Contrast Media-induced Renal Cell Injury

Effects of fumonisin B1 (FB1) on ioversol-induced cell injury in LLC-PK1 cells (A) and in mice (B). (C) Comparative effects of a variety of contrast media on ceramide-like immunoreactivity and cell viability in LLC-PK1 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

剤腎症発現の起因である可能性を初めて見出した、極めて重要な知見であることが考えられた。さらに、6種類の非イオン性造影剤を用いて比較検討を行った際、各造影剤の腎細胞傷害作用の程度とセラミド産生量との間には有意な相関が認められ [Fig. 3(C)], その一方で、これまで腎細胞障害への影響が示唆されてきた造影剤の浸透圧や粘稠度は、障害作用の程度との間に相関を示さなかった。³¹⁾ 本研究においてセラミド産生及び腎細胞への障害作用が最も弱かったイオジキサノールは、臨床試験においても他の造影剤に比べて腎障害の誘発率が低いことが報告されている。³²⁾ すなわち、筆者らの作製した造影剤腎障害モデルや、本研究により得られた知見を用いることで、新たな造影剤開発をはじめ、後発品造影剤による腎臓への影響等についても検討可能であることが考えられた。

5. おわりに

本研究により、造影剤腎障害の発現機序が明らかになったほか、セラミドの増加が腎障害発現の起因

である可能性が示唆されるなど、重要な知見が得られた。さらに、ベラプロストにより腎に多く分布する PGI₂ レセプターを刺激し、細胞内 cAMP 産生を高めることが、造影剤腎症に対する有効な予防策になり得る可能性が示された。

現在、われわれは冠動脈造影検査を施行される腎機能低下患者を対象として、造影剤腎症に対するベラプロストの予防効果についての臨床試験を実施中であるが、本知見を基に海外においても同様の試験が実施され、その効果が報告されている。³³⁾

造影剤を用いた検査は、腎機能低下といったリスクファクターを有する患者においても実施せざるを得ないことが多く、造影剤腎症の有効な予防法が早期に確立されることが期待される。

謝辞 本研究は、九州大学病院薬剤部並びに同協力講座である九州大学大学院薬学府医薬品情報解析学分野にて行ったものであり、終始懇切なご指導とご教示を賜りました、同教授 大石了三先生に

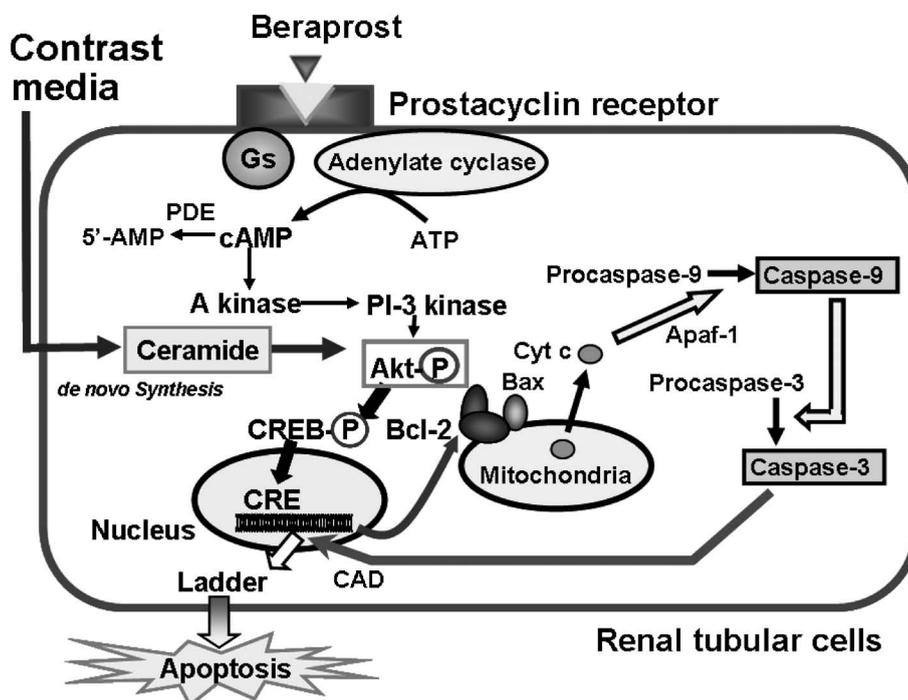


Fig. 4. Possible Mechanisms Underlying Contrast Media-induced Renal Tubular Cell Apoptosis and Protective Action by Beraprost against It

謹んで深謝いたします。また、本研究を行うに当たり、九州大学病院薬剤部助教授時代より、あらゆる面で終始変わらぬご指導とご鞭撻を賜りました、岐阜大学医学部附属病院薬剤部教授 伊藤善規先生に心より感謝を申し上げます。本研究を遂行するに当たり、多大なるご助力を賜りました、立命館大学薬学部教授 藤田卓也先生に深く感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、多くのご助言とご協力を頂きました、九州大学大学院医学研究院附属心臓血管研究施設准教授 平野勝也先生に心より感謝申し上げます。本研究を行うに当たり、多くのご協力を頂きました、九州大学病院薬剤部の諸先生方並びに、九州大学大学院薬学府医薬品情報解析学分野の皆様方に心から感謝いたします。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金により実施されたことを付記します。

REFERENCES

- 1) Lasser E. C., Lyon S. G., Berry C. C., *Radiology*, **203**, 605-610 (1997).
- 2) Porter G. A., *Miner. Electrolyte Metab.*, **20**, 232-243 (1994).
- 3) Mehran R., Aymong E. D., Nikolsky E., Lasic Z., Iakovou I., Fahy M., Mintz G. S., Lansky A. J., Moses J. W., Stone G. W., Leon M. B., Dangas G., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **44**, 1393-1399 (2004).
- 4) Morcos S. K., Thomsen H. S., *Abdom Imaging.*, **28**, 187-190 (2003).
- 5) Rihal C. S., Textor S. C., Grill D. E., Berger P. B., Ting H. H., Best P. J., Singh M., Bell M. R., Barsness G. W., Mathew V., Garratt K. N., Holmes Jr. D. R., *Circulation*, **105**, 2259-2264 (2002).
- 6) Kurnik B. R., Weisberg L. S., Cuttler I. M., Kurnik P. B., *J. Lab. Clin. Med.*, **116**, 27-36 (1990).
- 7) Weisberg L. S., Kurnik P. B., Kurnik B. R., *Kidney Int.*, **41**, 1408-1415 (1992).
- 8) Kolonko A., Wiecek A., Kokot F., *J. Nephrol.*, **11**, 151-156 (1998).
- 9) Murphy S. W., Barrett B. J., Parfrey P. S., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**, 177-182 (2000).
- 10) Tepel M., van der Giet M., Schwarzfeld C., Laufer U., Liermann D., Zidek W., *N. Engl. J. Med.*, **343**, 180-184 (2000).
- 11) Birck R., Krzossok S., Markowitz F., Schnulle P., van der Woude F. J., Braun C., *Lancet*, **362**, 598-603 (2003).

- 12) Isenbarger D. W., Kent S. M., O'Malley P. G., *Am. J. Cardiol.*, **92**, 1454–1458 (2003).
- 13) Alonso A., Lau J., Jaber B. L., *Am. J. Kidney Dis.*, **43**, 1–9 (2004).
- 14) Pannu N., Manns B., Lee H., Tonelli M., *Kidney Int.*, **65**, 1366–1374 (2004).
- 15) Stenstrom D. A., Muldoon L. L., Armijo-Medina H., Watnick S., Doolittle N. D., Kaufman J. A., Peterson D. R., Bubalo J., Neuwelt E. A., *J. Vasc. Interv. Radiol.*, **19**, 309–318 (2008).
- 16) Humes H. D., Hunt D. A., White M. D., *Am. J. Physiol.*, **252**, F246–255 (1987).
- 17) Nakahama H., Kakihara M., Fukuhara Y., Orita Y., Kamada T., *Nephron*, **57**, 379–380 (1991).
- 18) Andersen K. J., Christensen E. I., Vik H., *Invest. Radiol.*, **29**, 955–962 (1994).
- 19) Cunha M. A., Schor N., *Ren. Fail.*, **24**, 655–658 (2002).
- 20) Yano T., Itoh Y., Sendo T., Kubota T., Oishi R., *Kidney Int.*, **64**, 2052–2063 (2003).
- 21) Yano T., Itoh Y., Kubota T., Sendo T., Koyama T., Fujita T., Saeki K., Yuo A., Oishi R., *Am. J. Pathol.*, **166**, 1333–1342 (2005).
- 22) Wilson B. E., Mochon E., Boxer L. M., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5546–5556 (1996).
- 23) Chen W., Yu Y.L., Lee S. F., Chiang Y. J., Chao J. R., Huang J. H., Chiong J. H., Huang C. J., Lai M. Z., Yang-Yen H. F., Yen J. J., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4636–4646 (2001).
- 24) Yano T., Itoh Y., Kubota T., Sendo T., Oishi R., *Kidney Int.*, **65**, 1654–1663 (2004).
- 25) Boie Y., Rushmore T. H., Darmon-Goodwin A., Grygorczyk R., Slipetz D. M., Metters K. M., Abramovitz M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 12173–12178 (1994).
- 26) Kömhoff M., Lesener B., Nakao K., Seyberth H. W., Nüsing R. M., *Kidney Int.*, **54**, 1899–1908 (1998).
- 27) Villa E., Rábano A., Ruilope L. M., García-Robles R., *Am J Hypertens.*, **10**, 202–208 (1997).
- 28) Tobimatsu M., Ueda Y., Saito S., Tsumagari T., Konomi K., *Ann. Surg.*, **208**, 65–70 (1988).
- 29) Paller M. S., Manivel J. C., *Kidney Int.*, **42**, 1345–1354 (1992).
- 30) Nielsen C. B., Bech J. N., Pedersen E. B., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **44**, 471–476 (1997).
- 31) Itoh Y., Yano T., Sendo T., Sueyasu M., Hirano K., Kanaide H., Oishi R., *Kidney Int.*, **69**, 288–297 (2006).
- 32) McCullough P. A., Bertrand M. E., Brinker J. A., Stacul F., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **48**, 692–699 (2006).
- 33) Spargias K., Adreanides E., Giamouzis G., Karagiannis S., Gouziouta A., Manginas A., Voudris V., Pavlides G., Cokkinos D. V., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **62**, 589–595 (2006).