

抗悪性腫瘍薬シスプラチンによる腎障害発現への活性酸素とカルシウムの関与

河合悦子

Involvement of Intracellular Calcium and Reactive Oxygen Species in an Antitumor agent Cisplatin-induced Nephrotoxicity

Yoshiko KAWAI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 24, 2006; Accepted December 15, 2006)

We examined the relationship of reactive oxygen species and intracellular calcium in renal failure induced by an antitumor agent, cisplatin. The level of plasma creatinine, blood urea nitrogen and urinary excretion of γ -glutamyltranspeptidase as an index of nephrotoxicity increased 72 hr after administration of cisplatin. This increment induced by cisplatin was significantly inhibited by a hydroxyl radical scavenger, EPC-K1. So, we investigated influence of deferoxamine, a chelator of iron which is associated with production of hydroxyl radicals, on nephrotoxicity induced by cisplatin. In the experiment using rat renal cortical slices, cisplatin increased lipid peroxides and decreased the uptake of an organic anion, *p*-aminohippuric acid (PAH), into renal slices. Pretreatment of rats with deferoxamine inhibited the increase in lipid peroxides and recovered the decline in activity of PAH transport to renal slices. Furthermore, we examined the relationship between renal cell injury and intracellular calcium concentration in LLC-PK₁ cells treated with cisplatin. Cisplatin increased the production of reactive oxygen radicals, superoxide anion, in LLC-PK₁ cells. The enhancement of reactive oxygen species production and cell injury by cisplatin was suppressed by calcium channel blockers, nifedipine and flunarizine. These results suggest that the increase of intracellular calcium by cisplatin causes a superoxide anion generation and iron release to promote the production of cisplatin-induced hydroxyl radicals in renal cells.

Key words—cisplatin; nephrotoxicity; reactive oxygen species; intracellular calcium; renal epithelial cell

1. はじめに

抗悪性腫瘍薬シスプラチンは、優れた抗腫瘍効果を示し、肺癌はもとより睾丸腫瘍、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、胃癌、食道癌などに高い奏効率が示されている。^{1),2)} シスプラチンは腎障害、胃腸障害(嘔吐)、聴覚障害および骨髄抑制などの副作用を有しており、特に腎障害は重篤で臨床でのその利用が制限される場合があり用量制限因子となっている。^{3),4)}

腎臓は排泄器官であることから、薬物あるいは外来異物、さらにそれらの代謝物による影響を最も受けやすい臓器と考えられている。その理由としては、腎臓への豊富な血液量および尿細管腔内での濃縮や尿細管上皮細胞への蓄積などが挙げられる。シスプラチンにおいても、腎臓での蓄積が確認されており、シスプラチンによる尿細管障害は用量依存性であると報告されている。^{5),6)}

シスプラチンによる腎障害発現には、アポトーシ

スや酸化ストレスおよび DNA 障害などが関わっていることが報告されている。⁷⁻¹⁰⁾ その中でも、酸化ストレスはシスプラチンによるアポトーシス誘導にも関与しているとの報告もあることから、腎障害発現機序において重要な役割を果たしていることは明らかである。

一方、多くの細胞障害に細胞内カルシウム濃度の変動が関わっていることが知られている。しかし、シスプラチンによる腎細胞障害に対するカルシウムの役割についてはよくわかっていない。

腎障害発現に活性酸素が関わりと考えられていることから、^{7,8)} ラット腎へのシスプラチンによる腎障害への活性酸素の関与とその産生経路について調べた。併せて、活性酸素産生への細胞内カルシウム濃度の変動との関係について、カルシウム拮抗薬を用いて調べた。

2. 方法

実験動物

実験には体重 180 g ~ 230 g の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (日本エスエルシー) を用いた。動物は 12 時間照明, 12 時間消灯, 恒温 (24°C ± 1), 恒湿 (55 ± 5 %) の飼育室で飼育した。なお、全ての動物実験は大阪薬科大学動物実験指針に従って行った。

薬物投与

SD 系雄性ラットは、生理食塩水を投与した群、シスプラチン (3.75 mg/kg, 7.5 mg/kg) を投与した群およびシスプラチン (7.5 mg/kg) に EPC-K1 10 mg/kg を併用した群に分けて実験を行った。シスプラチンは尾静脈より投与し、EPC-K1 はシスプラチン投与直後に腹腔内投与した。シスプラチン投与 48 時間後より代謝ケージ内で 18 時間採尿を行った。

腎臓への影響検討

尿量を計測後、尿試料は遠心処理を行い、尿中の γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) を測定した。薬物投与 72 時間後に pentobarbital (50 mg/kg,

i.p.) 麻酔下、採血を行った。BUN は Coulombe と Favoeau の方法で、血漿クレアチニン濃度は Jaffé 法で比色定量した。 γ -GTP の測定には γ -GTP C-テストワコー (和光純薬) を用いた。

腎皮質切片の調製およびインキュベーション¹⁸⁾

鉄キレート剤デフェロキサミン (DFX) 200 mg/kg (i.v.) あるいは生理食塩水を投与 30 分後に SD 系雄性ラットより腎臓を摘出した。腎臓の被膜および髄質を除去し、皮質部の切片を作成した。腎皮質切片は、37°C で 100% 酸素通気下において、シスプラチン 2 mM あるいは 50 μ M Fe-EDTA を含むあるいは含まない反応液 [11.5 mM グルコース含有 HEPES 緩衝液 (1.2 mM MgCl₂, 134 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5.8 mM HEPES, pH 7.4)] 中にて一定時間インキュベーションした。インキュベーション後、切片および反応液を回収し、腎細胞機能の指標として腎皮質切片への有機弱酸パラアミノ馬尿酸 (PAH) の蓄積量を測定した。また、活性酸素の関与は切片中の過酸化脂質量を測定することにより検討した。

Fe-EDTA 調製方法¹⁹⁾

50 μ M Fe-EDTA は、50 μ M Na₂H₂EDTA 溶液と 50 μ M FeCl₂ 溶液を等量混合した。

腎皮質切片へのパラアミノ馬尿酸 (PAH) の取り込み能²⁰⁾

腎皮質切片を一定時間インキュベーション後、回収した反応液は遠心処理後、最終的に 5 % TCA を含むように希釈した。切片 60 mg は 5 % TCA 溶液 5 mL でホモジナイズした。切片への PAH 取り込み能は、切片中の PAH 量と反応液中の PAH 量の比 (S/M 比) で評価した。

過酸化脂質量測定²¹⁾

過酸化脂質量はチオバルビツール酸陽性物質 (TBARS) として測定した。切片のホモジネート 0.3 mL に TBA 試薬 (0.375 % TBA, 0.25 M HCl, 15 % TCA) 2.7 mL を加えて沸騰水浴中にて 15 分間反応後、遠心処理を行いその上清を 535 nm にて吸光度測定した。

細胞培養

実験にはブタ腎近位尿細管由来の樹立細胞株 LLC-PK₁ 細胞を用いた。培地にはダルベッコ改変培地 / 栄養混合物 F-12 Ham (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham, DMEM/F-12) を使用し、その培地に 5% 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (TRACE) を加えたもので細胞を培養した。

細胞への薬物曝露

継代 4 日目のコンフルエントに達した LLC-PK₁ 細胞の培地をシスプラチン (500 μM) を含むあるいは含まない DMEM/F-12 (FBS 不含) と交換した。

細胞障害の指標としての乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定

細胞障害の指標として、細胞から培地に遊離した LDH 活性を測定した。シスプラチン曝露後に回収した培地を遠心後、その上清について LDH 測定キット LDH CII テストワコー (和光純薬) を用いて酵素活性を測定した。

活性酸素 - NBT 法による測定

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法を用いて活性酸素であるスーパーオキシドアニオンを測定した²⁵⁾。実験には 35 mm のディッシュに培養した細胞を用いた。

統計処理

すべての結果は平均 ± 標準誤差として表示し、統計学的検定は、一元配置分散分析の後に Bonferroni/Dunn を行った。p<0.05 をもって有意差ありとした。

3. 結果

シスプラチン 3.75 および 7.5 mg/kg 投与による腎臓への影響について調べた。シスプラチンは、ラットへの投与 72 時間後において、用量依存的に血漿クレアチニンおよび BUN を増大させた (Table 1)。また、7.5 mg/kg のシスプラチン投与は、尿細管が障害を受けるとその尿中への排泄量が増大する γ-GTP の排泄量も増大させた (Fig. 2)。このシスプラチンによる腎障害への活性酸素の関与を

調べる目的で、ヒドロキシラジカルスカベンジャー EPC-K1 の影響について検討した。シスプラチンによる BUN および尿中への γ-GTP 排泄量増大は、いずれも EPC-K1 により抑制された (Figs. 1, 2)。

Table 1. Changes in urine volume and renal function in rats treated with cisplatin

	Urine volume (mL/100g)	Plasma creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Control	5.162 ± 0.296	0.421 ± 0.114	19.88 ± 1.142
CDDP 3.75 mg/kg	9.976 ± 2.180	0.629 ± 0.100*	34.73 ± 4.792*
7.5 mg/kg	10.800 ± 1.231	0.947 ± 0.174*	56.66 ± 5.340*

The urine volume, plasma creatinine and BUN were measured 72 hr after cisplatin (CDDP, 3.75, 7.5 mg/kg, i.v.) injection.

Data are the mean ± S.E.

* p<0.001, compared with control.

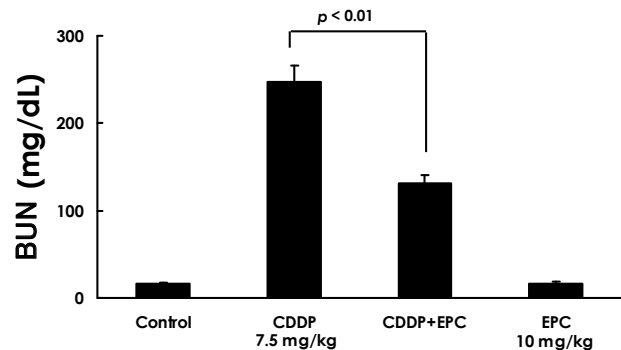


Fig. 1. Effect of EPC-K1 (EPC) on the increase in blood urea nitrogen (BUN) induced by cisplatin (CDDP)

EPC-K1 (10 mg/kg, i.p.) was coadministered with cisplatin (7.5 mg/kg, i.v.). The level of BUN was measured at 4 days after the injection of cisplatin. Data are the mean ± S.E.

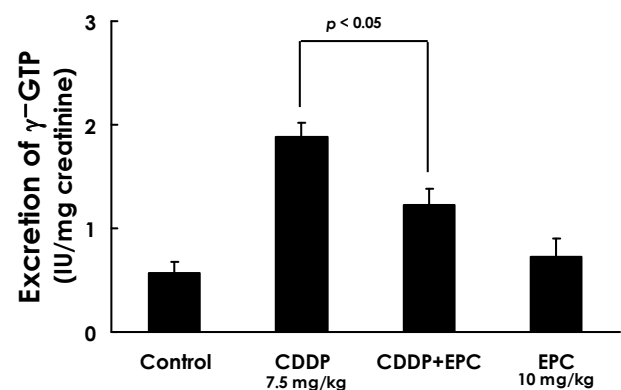


Fig. 2. Effect of EPC-K1 (EPC) on the increase in urinary excretion of γ-GTP induced by cisplatin (CDDP)

EPC-K1 (10 mg/kg, i.p.) was coadministered with cisplatin (7.5 mg/kg, i.v.). The level of γ-glutamyltranspeptidase (γ-GTP) in urine was measured at 4 days after the injection of cisplatin. Data are the mean ± S.E.

シスプラチンによる腎障害に対してEPC-K1が保護効果を示したことから、シスプラチンがヒドロキシルラジカルの産生を増大させている可能性が考えられる。そこで、ヒドロキシルラジカル産生を促進すると考えられている鉄イオンの関与を鉄キレート剤デフェロキサミンを用いることにより検討した。また、デフェロキサミンの影響が鉄キレートによる効果であることを確認する目的で、Fe-EDTAによる影響も併せて調べた。ラット腎皮質切片において、シスプラチンおよびFe-EDTAとともに過酸化脂質(TBARS)量を増大させた(Fig. 3)。これらの増大は、ラットにあらかじめデフェロキサミンを処置しておくことによりほぼコントロールレベルにまで抑制された。腎皮質切片への有機弱酸PAHの取り込み能は、シスプラチンおよびFe-EDTAともに阻害された。特にシスプラチンによる阻害は顕著であった。シスプラチンなどによるTBARS増大を抑制したデフェロキサミンは、シスプラチンおよびFe-EDTAによるPAH輸送阻害も有意に回復させた(Fig. 4)。

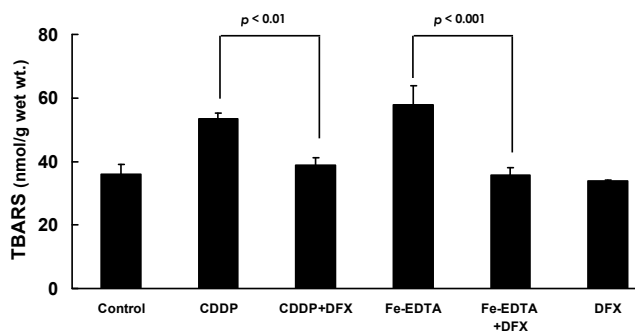


Fig. 3. Effect of treatment of rats with deferoxamine (DFX) on the increase in level of lipid peroxide (TBARS) induced by cisplatin (CDDP) and Fe-EDTA in kidney cortical slices

Slices were prepared 30 min after the injection of DFX (200 mg/kg, i.v.) to rats and incubated at 37°C for 60 min in medium containing 2 mM CDDP and 50 μ M Fe²⁺-EDTA. Data are the mean \pm S.E.

シスプラチンによる活性酸素産生増大へのカルシウムの関与について、培養腎上皮細胞株LLC-PK₁を用いて調べた。シスプラチン 500 μ MをLLC-PK₁に1, 3, 5時間曝露すると、時間依存的に細胞内の活性酸素産生増大が見られた(Fig. 5)。顕著な活性酸素増大がみられた曝露5時

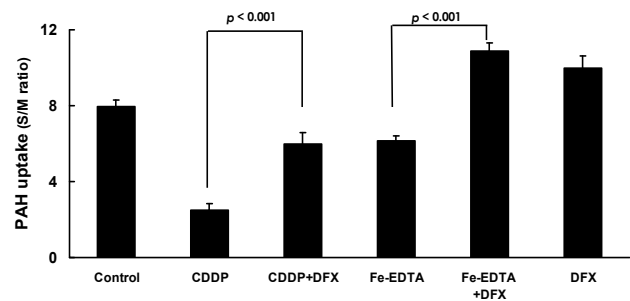


Fig. 4. Effect of treatment of rats with deferoxamine (DFX) on the decrease in uptake of *p*-amino hippurate (PAH) induced by cisplatin (CDDP) and Fe-EDTA in kidney cortical slices

Slices were prepared 30 min after the injection of DFX (200 mg/kg, i.v.) to rats and incubated at 37°C for 60 min in medium containing 2 mM CDDP and 50 μ M Fe²⁺-EDTA. Data are the mean \pm S.E.

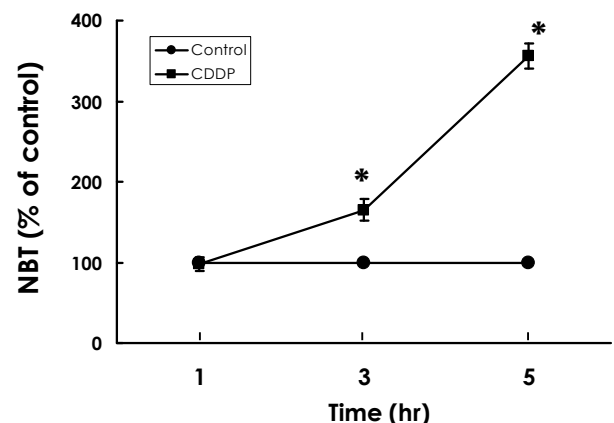


Fig. 5. Time-dependent effect of cisplatin (CDDP) on reactive oxygen species (ROS) production in LLC-PK₁ cells. LLC-PK₁ cells were incubated in serum-free medium containing CDDP (500 μ M) for 1, 3, 5 h.

Values represent the mean \pm S.E. * p <0.001 compared to the respective control.

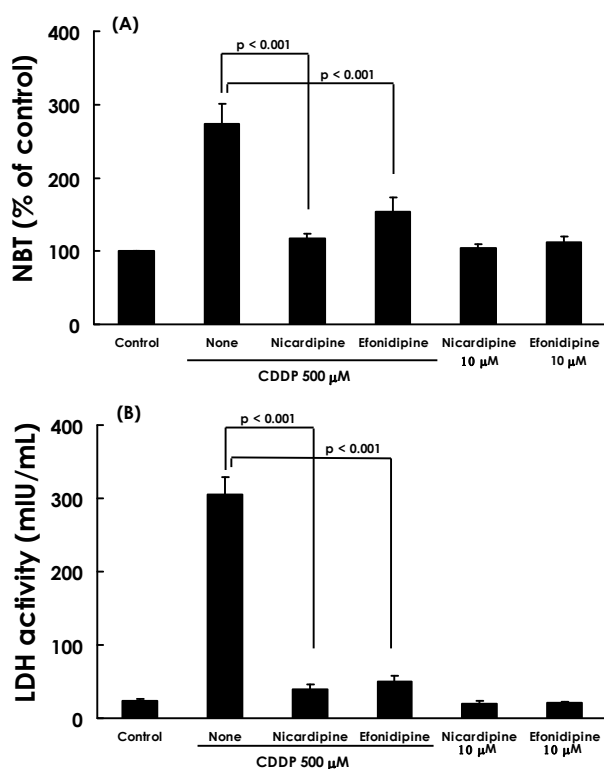


Fig. 6. Effect of calcium channel blockers on increase in reactive oxygen species (ROS) production in LLC-PK₁ cells (A) and cell injury (B) induced by cisplatin (CDDP). LLC-PK₁ cells were incubated in serum-free medium containing CDDP (500 μM) with or without calcium channel blockers for 5 h.

Values represent the mean ± S.E.

間後において、カルシウム拮抗薬ニカルジピンおよびエホニジピンの影響を調べた。シスプラチン曝露5時間後での活性酸素産生増大は、ニカルジピンおよびエホニジピンによって有意に抑制された (Fig. 6A)。また、活性酸素産生増大を抑制したニカルジピンやエホニジピンは、シスプラチンによる細胞障害も抑制した (Fig. 6B)。

4. 考察

シスプラチンによる腎障害は、ヒドロキシルラジカスカベンジャー EPC-K1 により抑制された。また、腎皮質切片の実験においては、鉄キレート剤デフェロキサミンがシスプラチンによる過酸化

脂質の増大を抑制し、さらに有機弱酸 PAH の輸送能低下を回復させた。これらのことから、シスプラチンによる活性酸素産生増大が腎細胞機能障害を引き起こしていることが明確となった。

今回の実験では、NBT 法によりスーパーオキシドアニオンを検出しており、シスプラチンが培養腎上皮細胞でスーパーオキシドアニオン生成を増大させることがわかった。すでに、培養腎上皮細胞においてシスプラチンが NADPH oxidase を介して活性酸素の産生を増大させることを報告している。²⁶⁾ このスーパーオキシドアニオンは、細胞内の SOD により過酸化水素へと代謝される。また、シスプラチンは培養腎上皮細胞において、過酸化水素の産生を促進するとも報告されている。⁹⁾ そして、過酸化水素は鉄イオンの存在下においてヒドロキシルラジカルを生成することがわかっている。²²⁾ よって、シスプラチンにより増大したスーパーオキシドアニオンを介して過剰な過酸化水素が産生され、鉄イオンの触媒でヒドロキシルラジカルへと代謝されその量が増大した可能性が示唆される。特に、活性酸素種の中でも、ヒドロキシルラジカルは細胞の構成成分 (脂質, タンパク質, 核酸など) との反応性が高く、多くの細胞機能障害の原因として考えられている。^{16),17)} 故に、シスプラチンにより過剰に産生されたヒドロキシルラジカルが細胞障害を引き起こすと考えられる。

シスプラチンによる腎障害へのカルシウムの関与を示唆する報告がある。カルシウム拮抗薬前処置により、シスプラチンによる腎障害が軽減されたと報告されている。¹³⁾ 一方でシスプラチンによる腎障害がカルシウム拮抗薬で増悪するとの報告もされている。¹⁴⁾ Kim らは、腎皮質切片を用いた実験において、シスプラチンは過酸化脂質量の増大や細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させ、細胞機能を低下させたが、シスプラチンによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は過酸化脂質増大非依存的であったと報告している。¹⁵⁾ このようにシスプラチンによる腎障害発現において、活性酸素と $[Ca^{2+}]_i$ 変動との関係についてはいまだ明らかではない。

通常, $[Ca^{2+}]_i$ は低く保たれており, 酵素活性を含めた多くの細胞機能の制御に関わっている。²³⁾ この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は活性酸素による膜障害などにより引き起こされるとの報告がある一方で, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が, 活性酸素の生成増大を起こすとの報告もある。²⁴⁾ 今回, 細胞外から細胞内へのカルシウムの流入をカルシウム拮抗薬が抑制すると, シスプラチンによる活性酸素の産生増大が抑制されたという結果が得られた。すでに LLC-PK1 細胞において, シスプラチンが $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることを報告している。²⁶⁾ これらのことから, シスプラチンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が活性酸素生成を増大させる引き金になっていると考えられる。

今回の研究から, シスプラチンは腎細胞において, 活性酸素産生を増大させるが, その生成経路には鉄の触媒を介しており, その結果ヒドロキシルラジカルの産生増大が促され, 細胞障害を引き起こすことが示唆される。このシスプラチンによる活性酸素産生増大には, 細胞内カルシウム増大が関わる可能性が考えられる。

REFERENCES

- 1) Rosenberg B., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977; **91**: 129-150.
- 2) Lebwohl D., Canetta R., *Eur. J. Cancer.*, 1998; **34**: 1522-1534.
- 3) Arany I., Safirstein RL., *Semin. Nephrol.*, 2003; **23**: 460-464.
- 4) Doby DC., Levi J., Jacobs C., Kosek J., Weiner MW., *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980; **213**: 551-556.
- 5) Lehane D., Winston A., Gray R., Daskal Y., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1979; **5**: 1393-1399.
- 6) Madias NE., Harrington JT., *Am. J. Med.*, 1978; **65**: 307-314.
- 7) Boulikas T., Vougiouka M., *Oncology Reports.*, 2003; **10**: 1663-1682.
- 8) Okamura M., Hashimoto K., Shimada J., Sakagami H., *Anticancer Res.*, 2004; **24**: 655-662.
- 9) Tsutsumishita Y., Onda T., Okada K., Takeda M., Endou H., Futaki S., et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1998; **242**: 310-312.
- 10) Gong JG., Costanzo A., Yang HQ., Melino G., Kaelin WG. Jr., Levrero M., Wang JY., *Nature.*, 1999; **399**: 806-809.
- 11) Chien KR., Peau RG., Farber JL., *Am J Pathol.*, 1979; **97**: 505-529.
- 12) Nicotera P., Hartzell P., Baldi C., Svensson SA., Bellomo G., Orrenius S., *J Biol Chem.*, 1986; **261**: 14628-14635.
- 13) Deray G., Dubois M., Beaufile H., Cacoub P., Anouar M., Jaudon MC., et al., *Clin Nephrol.*, 1988; **30**: 146-150.
- 14) Uozumi J., Ueda T., Yasumasu T., Koikawa Y., Kumazawa J., *Int Urol Nephrol.*, 1992; **24**: 549-553.
- 15) Kim YK., Jung JS., Lee SH., Kim YW., *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1997; **146**: 261-269.
- 16) Halliwell B., Whiteman M., *Br J Pharmacol.*, 2004; **142**: 231-255.
- 17) Baliga R., Ueda N., Walker PD., Shah SV., *Drug Metab Rev.*, 1999; **31**: 971-997.
- 18) Gemba M., Tachibana A., Suguhara K., Hori M., Nakajima M., *Renal Physiol.*, 1985; **8**: 179-188.
- 19) Bates GW., Billups C., Saltman PJ., *Biol. Chem.*, 1967; **242**: 2810-2815.
- 20) Bratton AC., Marshall Jr. EK., *J. Biol. Chem.*, 1939; **128**: 537-550.
- 21) Buege JA., Aust SD., *Methods Enzymol.*, 1978; **52**: 302-310.
- 22) Minotti G., Aust SD., *Chemistry and Physics of Lipids.*, 1987; **44**: 191-208.
- 23) Carafoli E., *Ann Rev Biochem.* 1987; **56**: 395-433.
- 24) Van de Water B., Zoetewij JP., de Bont HJGM, Mulder GJ., Nagelkerke JF., *J Biol Chem.*, 1994; **269**: 14546-14552.
- 25) Scheid C., Koul H., Hill WA., Lubner-Narod J., Kennington L., Honeyman T., et al., *Kidney Int.*, 1996; **49**: 413-419.
- 26) Yoshiko Kawai, Takafumi Nakao, Naoshi Kunimura, Yuka Kohada, Munekazu Gemba., *J. Pharmacol. Sci.*, 2006; **100**: 65-72