

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 木本 有美

題 目 :

Studies on the Renoprotective Effect of Bovine Lactoferrin on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity  
(シスプラチン誘発性腎毒性に対するウシ由来ラクトフェリンの腎保護効果に関する研究)

論文要旨 :

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II) is one of the most effective chemotherapeutic agents used to treat a variety of solid tumors, but it has limited clinical application because of its side effects. It is well known that cisplatin damages the proximal tubule in rat. The acute renal failure caused by cisplatin is typically characterized by signs such as a severe reduction in the glomerular filtration rate (GFR), a variable fall in the renal blood flow, and changes in urine volume and creatinine clearance. It is essential to develop practical ways to counteract the side effects of cisplatin.

It is known that increased expression of lipid peroxidation markers, such as malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), is closely associated with the severity of cisplatin-induced nephrotoxicity. However, it remains unclear whether protein oxidation markers, such as dityrosine and advanced oxidation protein products (AOPP), are associated with cisplatin-induced nephrotoxicity. Dityrosine recently has been developed as a biomarker of protein oxidation. Dityrosine is formed by ROS, enzymatic reactions, ultraviolet irradiation and lipid peroxidation. AOPP are defined as dityrosine-containing cross-linked protein products and are considered to be reliable markers for estimating the degree of protein oxidation.

Lactoferrin (Lf), an iron-binding glycoprotein is found in milk, tears, saliva, other external secretions, and in the secondary granules of neutrophils. Some physiological effects of Lf have been reported, including anti-inflammatory, antinociception, antistress, anti-oxidant, cell proliferative, and immunoregulatory properties. Åbrink *et al.* investigating the expression of Lf in the human kidney showed that Lf may act as anti-oxidant defense systems protecting the kidney against nonmicrobial oxidative injury. However, to our knowledge, there have been no published studies to date on the protective effect of Lf against nephrotoxicity.

The purposes of these studies were to clarify one of the mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity and the renoprotective effect of bovine Lf (bLf). We have had special interest in its variety of properties of Lf and investigated the novel functions of Lf based on its characteristic transportation systems.

First, we examined cisplatin-induced nephrotoxicity morphologically and immunohistochemically using novel protein oxidation markers, dityrosine and AOPP. The results of our experiments demonstrate that cisplatin has a site-specific nephrotoxic effect on the straight portion of the proximal tubule in the rat kidney and that immunohistochemical expression of dityrosine in the kidney tissue and plasma AOPP

concentration correlate with development of cisplatin-induced nephrotoxicity. Serum BUN and creatinine started increasing at the third day after cisplatin treatment, while tubular damage score and the number of TUNEL-positive cells showed significant increase at the second day. The expression of dityrosine was also detected from the second day and the intensity of expression was stronger as the histological changes were aggravated. It is suggested that histological changes in kidney occur earlier period of time than blood chemical changes are obvious and the expression of dityrosine was correlated with early changes in the kidney. Therefore, it is suggested that dityrosine and AOPP might be useful biomarkers for estimating the degree of oxidant-mediated protein damage in cisplatin-induced nephrotoxicity.

Secondly, we investigated the protective effect of bLf on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. We analyzed the mechanisms of renoprotective effect of bLf by assessing urine output and accumulated platinum (Pt) contents in the kidney. Cisplatin caused a significant increase of the plasma concentrations of BUN and creatinine. These renal deteriorations were well related to the histological changes. We demonstrated that pre-treatment with bLf to cisplatin-induced acute renal failure rats ameliorates renal tubular injury histologically and suppresses the deterioration of renal function. The renal abnormalities induced by cisplatin were significantly recovered by the oral administration of bLf. We showed that intravenous administration of bLf has a potent diuretic effect in dose-dependently on the normal rats. We assumed that bLf suppresses reduction of renal blood flow by means of improving vascular resistance induced by cisplatin.

To clarify one of the mechanisms of the renoprotective effect of bLf, we evaluated the Pt content in the kidney tissue at 48 hrs after cisplatin treatment. In the present study, the Pt content in the kidney of cisplatin treated rats tended to be larger than that of bLf pretreated rats. It is suggested that the less amount of Pt content in bLf treated acute renal failure rats was responsible for reduction of the tubular injury.

The present study clearly showed that bLf treatment provides significant amelioration against cisplatin-induced nephrotoxicity. It was suggested that when cisplatin-induced renal injury occurs, bLf causes the increment of urine output and prevents the accumulation of cisplatin in the renal tubule, consequently ameliorating renal injury.

In this study, we found a new property of bLf which has a protective effect on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. However, the further mechanisms, such as the carrier mediated cisplatin transportation in the tubular cells and the site bLf actually working, are still unclear. Further studies are needed, but our findings will inspire to develop a new approach to prevent and treat acute renal failure.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	木本有美
審査委員	主査：鳥取大学・教授 竹内 崇
	副査：山口大学・教授 奥田 優
	副査：鳥取大学・教授 日笠 喜朗
	副査：鳥取大学・教授 岡本 芳晴
	副査：鳥取大学・准教授 杉山 晶彦
題目	Studies on the Renoprotective effect of Bovine Lactoferrin on Cisplatin-induced Nephrotoxicity (シスプラチン誘発性腎毒性に対するウシ由来ラクトフェリンの腎保護効果に関する研究)

### 審査結果の要旨：

シスプラチン (*cis*-diamminedichloroplatinum II)は種々の固形癌に対する化学療法剤として広く使用されているが、副作用として腎不全を誘発する可能性があるため、適用が制限されている。シスプラチン誘発性腎不全は、近位尿細管腔内に移行したシスプラチンが尿細管上皮細胞に取り込まれ、細胞内に蓄積することで酸化障害を生じ、尿細管上皮細胞の変性・壊死を引き起こすものである。また、シスプラチン投与後に起こる腎糸球体濾過量(GFR)の低下は、尿細管障害をさらに重篤化することが知られている。これらシスプラチン誘発性腎障害を予防するために、あらかじめ輸液処置を施すことにより GFR を上昇させ、あるいは利尿薬や ACE 阻害薬の併用によって、体外へのシスプラチン排泄を促進させる処置を講じるケースが多い。しかしながら、より効果的な副作用軽減法を確立することにより、シスプラチンの適用例はさらに拡大することが期待される。

ラクトフェリンは、様々な体液中に含まれる鉄結合性糖タンパクであり、多くの動物の初乳中には高濃度のラクトフェリンが含まれている。ラクトフェリンは多機能タンパクとして知られるが、近年、血管拡張作用や抗酸化作用などが報告されている。

本研究では、シスプラチン誘発性腎障害の軽減法としてラクトフェリンに着目し、成熟ラットを用いた種々の実験により、ラクトフェリンによる腎保護効果とその作用機序の解明を試みたものである。

第 1 章では、シスプラチン誘発性腎障害の発現を経日的に解析し、これまで報告されている腎尿細管の形態学的変化、アポトーシスの発現、血漿 BUN およびクレアチニン濃度変化に加えて、新規のタンパク質酸化障害マーカーであるジチロシンおよび advanced oxidation

protein products (AOPP)の有用性について詳細な解析を行っている。その結果、HE 染色による病理形態学的変化では、シスプラチン投与後 2 日目に近位尿細管直部に軽度の変性が発現し始め、3 日目には顕著な水腫性変性、細胞質の空胞化および尿細管の拡張を認めた。TUNEL 染色においてもシスプラチン投与後 3 日目以降に顕著なアポトーシスの発現が認められた。一方、抗ジチロシンモノクローナル抗体による腎臓の免疫組織化学的解析では、シスプラチン投与後 2 日目から近位尿細管に明らかな陽性像が確認され、間質の細胞には陽性像が認められなかった。また、血漿 AOPP 濃度はシスプラチン投与後 3 日目から有意に上昇しており、腎臓での酸化障害が 2 日目から発現し、3 日目以降に重篤化することが示唆された。以上の結果から、シスプラチン誘発性腎障害では、投与後 2 日目以降に近位尿細管において特異的に細胞質内のタンパク質酸化障害が進行し、尿細管上皮細胞の変性・壊死がさらに進行すると血漿中にも AOPP 上昇が確認されることが明らかとなり、シスプラチン誘発性腎障害においてもジチロシンおよび AOPP はタンパク質酸化障害マーカーとして有用であることが示唆された。

第 2 章では、シスプラチンによる腎障害がラクトフェリンの経口投与によって軽減されるか否かについて検討した。その結果、ラクトフェリン投与群では、シスプラチン誘発性腎障害による BUN およびクレアチニンの上昇は有意に抑制され、病理組織学的にも近位尿細管直部の障害は軽減されていた。さらに、ラクトフェリンの作用機序の解析として、シスプラチンに由来する腎組織への白金蓄積量を計測したところ、ラクトフェリン投与群では白金の蓄積が有意に減少していた。白金蓄積低減効果の機序として、ラクトフェリンによる利尿効果の有無に着目し、麻酔下にて成熟ラットの両側尿管にカニューレを挿入し、ラクトフェリンの静脈内投与による尿量の変化を解析した。その結果、ラクトフェリンは心拍数および血圧に有意な変動を起こすことなく、ラットの尿量を用量依存性に増加させた。したがって、シスプラチン誘発性腎障害に対するラクトフェリンの腎保護効果には、少なくとも利尿効果による白金蓄積の抑制が関与することが明らかとなった。

本研究で得られた知見は、シスプラチン誘発性腎障害に対するラクトフェリンの腎保護効果を初めて明らかにしたものであり、シスプラチンによる抗癌治療を実施する際の新たな副作用軽減手段として有用であることが示唆された。さらに、ラクトフェリンの作用機序には、少なくとも利尿効果を介した白金の蓄積低下が関与していることも明らかとなり、今後、獣医臨床へ応用するための基礎データとして有用な知見が得られていると判断された。従って、審査委員一同は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。