

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08236

研究課題名(和文)敗血症性急性腎障害における発症機序の解明と早期発見法の開発

研究課題名(英文)exploring the mechanism of septic acute kidney injury

研究代表者

中野 大介(Nakano, Daisuke)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性急性腎障害(AKI)の発症機序について、検討した。本プロジェクトでは、敗血症に伴うAKIの発症において近位尿細管におけるパターン認識応答が非常に重要であることが証明された。また、このAKI発症の端緒となる現象は、後期の血行動態変化に対して、代償的に働いており、敗血症性AKIの病態の複雑さが再確認された。全身性炎症について、単一サイトカインの中和によるAKIの緩和は得られなかったが、単球・マクロファージが尿細管由来のAKIに対して、増悪にも緩和にも働くことがわかった。同時に、血管側からの作用として、尿細管由来機序とは独立し、糸球体ろ過量調節に重要である機序が判明した。

研究成果の概要(英文)：The project examined the mechanism for the onset of septic acute kidney injury (AKI). The study explored that the pattern-recognition receptors in the proximal tubules plays essential roles for the early-phase changes of lipopolysaccharide-induced AKI. Triggering this mechanism induced early-phase AKI; however, it works as a compensatory protective factor against the further progression of AKI that is induced mainly by hemodynamic changes, including glomerular filtration decline. Monocyte/macrophage showed a contribution to the early phase AKI and the effect was either protective or deteriorative; active phagocyte population protected kidney against lipopolysaccharide-induced AKI, and monocytes/macrophage with poor phagocytic activity made AKI more severe.

研究分野：腎臓薬理学

キーワード：敗血症 急性腎障害 生体イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、そのほとんどが院内感染によるものである。今日の進歩した医療技術でもって、合併症を併発した際の死亡率は日本国内で3割、米国で5割と言われている。特に、急性腎障害 (acute kidney injury, AKI) の発症は右肩上がりであり上昇している。対して、輸液および透析はAKI発症時における緊急処置の柱として長年行われてきたが、これに加わる新たな治療法として確立されたものはない。申請者は、平成24-25年の科学研究費補助金若手Bにおいて、(大血管手術などに伴う)虚血性AKIの成り立ちとその予防法について成果を挙げた。しかしながら、後述のように敗血症に伴うAKIは、その特殊性が際立っており、上述の成果を応用することはできなかった。

虚血性や薬剤性のAKIでは、腎機能低下とともに細胞死を特徴とする病理学的変化が確認される。一方で、敗血症AKIにおいて、腎臓の細胞が形態異常を起こすことは稀であり、病理組織学的な検討から機序を推測することは難しい。これに対して現在、基礎研究領域では、遺伝子改変動物などを用いて、AKIの重症度を比較する試験などが行われている。しかしながら、発症後に残る病態痕跡が乏しいことが、より深い理解に対する障壁となっており、発症中の病態解析が必要と考えられる。一方、臨床の場合においては、その多くがICUにて起こる敗血症AKIに対して、患者の救命(敗血症の治療)が最優先されるため、AKI病態の詳細な解析は難しいのが現状である。すなわち基礎・臨床研究ともに、新たな方向性でのアプローチが求められている。

これに対して申請者は、AKI発症中における腎および細胞機能障害の機序、更には合併による敗血症重症化のメカニズムを明らかにすることが、臨床(ICU)における次世代治療戦略の構築につながると考えた。その手段として、既に当研究室で実績のある腎リアルタイムイメージング法(図1)を用いた戦略を組んでいる。

多光子レーザー顕微鏡を用いた申請者の開発した手法を応用し、生きた動物の腎臓を細胞分析レベルの空間解像度により、かつ秒単位にてリアルタイムに可視化・観察することにより、敗血症AKI発症時における腎病態の解明を目指している。この手法は申請者の完全なオリジナルであり、同様・類似の手法を用いた論文は実験開始時(2015年)の時点で存在しなかった。申請者は、従来AKIの発症機序として教科書に記載されてきた「血圧低下・糸球体濾過量の減少」よりも、はるかに早い時期に「近位尿細管における尿の滞留」が生じることを発表し、この領域でイニシアチブを獲っている。本研究計画では、AKI発症中の腎近位尿細管における生命現象を明らかにし、この超早期現象に特徴的なマーカーの発見、予防的治療法の開発に挑む。

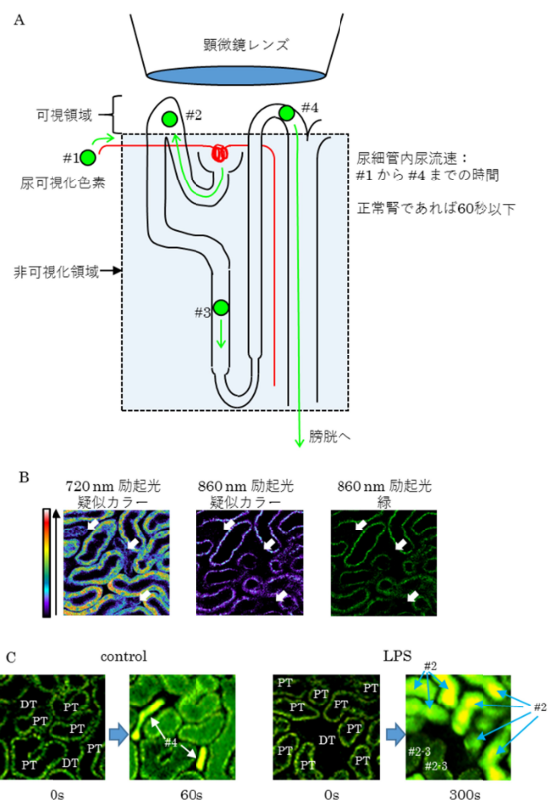


図1. 生体イメージングによる尿流速測定技術の一例(模式図)。尿流速は尿と共に流れる蛍光色素が腎内に出現してから遠位尿細管(#4の位置)に現れるまでの時間により計測した。A: 緑の円で表現した蛍光色素が輸入細動脈(#1)から糸球体に入り、自由にろ過される。糸球体直下の近位尿細管曲部(#2)において、原尿の流入速度を測定することにより、糸球体ろ過速度を推察できる。蛍光色素はその後、非可視化領域である深いネフロンに流れる。この部分での尿流速測定はできない。その後、蛍光色素が遠位ネフロン(#4)にまで流れつくと、再び測定が可能となる。正常なラットやマウスであれば、#1から#4までの時間は60秒以下である。全身血圧や糸球体ろ過速度の低下は、#2に流入する速度により判別可能である。同時に、#2への流入速度が正常であり、#4への流入速度が減少していれば、尿細管における尿流速の減少が生じていることになる。B: このイメージング技法において、近位尿細管は非常に強い自家蛍光により判別される。720 nm および 860 nm の励起光において、矢印で示す領域は周囲の尿細管よりも自家蛍光が弱い。これらの尿細管は遠位ネフロンである。事実、蛍光色素を正常マウスに静脈内投与すると、必ず、自家蛍光の強い尿細管に最初に現れ(20秒以内に消失)、その後、投与40秒前後において遠位ネフロンに出現する。C: 正常マウスとLPS投与マウスにおける画像。正常マウスでは、蛍光色素は矢印で示した遠位ネフロンへ60秒以内に流入している。一方で、LPSマウスでは、300秒を経過しても遠位ネフロンへは出現せず、画像上部の近位尿細管にて滞留していることがわかる。

### 2. 研究の目的

AKIの診断定義は、急激な腎機能低下と尿量の減少である。腎の基本的な機能である尿生成が障害を受けるために、透析により腎機能を代替することが、現在の最終的な救命・治療手段である。これに対して、本研究計画では、尿生成機能障害の成因を解き明かし、敗血症患者におけるAKI合併の減少を目的とする。

### 3. 研究の方法

概要として、急性腎障害は従来の発症測定マーカーに加えて、2光子レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングにより、細菌由来毒素の腎臓における標的を同定し、腎障害発症

メカニズム解明に取り組んだ。

敗血症腎における尿生成障害は、生体イメージング下において蛍光標識イヌリンを投与することにより描出した。Lipopolysaccharide (LPS) や腸内細菌を蛍光標識することにより、細菌由来物質の反応部位(古典的には単球・マクロファージ)を描出した。予備実験にて、LPS を含む細菌由来物質が近位尿細管に蓄積し、その尿細管において AKI が生じていることを確認していた(図2)。

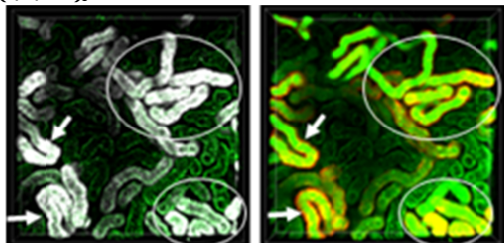


図2. 蛍光標識LPSの腎における結合部位(左)と各ネフロンにおける尿流(右)を描出した実験結果。LPSなどの細菌由来毒素は腎において lipid A 依存的に近位尿細管に蓄積する。尿流の生体イメージングにより、LPS蓄積ネフロン(円、矢印)において、尿が滞留している像が確認できる。この近位尿細管における尿の滞留が、最終尿量の減少=乏尿の原因であると考えられ、敗血症AKIの治療ターゲットとなることが期待される。

このことから AKI 予防治療戦略のターゲットは(全身性炎症とは独立して)腎尿管局所にあるとの仮説を立案し、この仮説を証明するために、以下の5点を検討した。

- (1) 敗血症における全身性炎症と近位尿細管における尿生成障害との関係を探る目的で、抗 TNF- $\alpha$  あるいは抗 IL-6 抗体(中和) clodronate liposome(食細胞死滅)を用いた。同時に、ヌードマウスおよび NODscid マウスを用いて、T、B および NK 細胞の関与も調べた。LPS および盲腸結紮穿孔法により作成した敗血症モデルにて、細菌由来物質の尿細管への蓄積(図2)や尿生成に対する上記薬物の影響を検討した。
- (2) 近位尿細管における conditional-KO マウスを、タモキシフェン誘導性 Cre を発現する NDRG-1 CreERT2 マウスと TLR4 floxed マウスにより作成し、イメージングによる尿生成障害解析を行った。
- (3) 尿管 TLR4 に続く細胞フェノタイプとして、細胞間隙破綻による尿管からの尿漏れであるとの仮説の元に、培養近位尿管を用いて、タイトジャンクション発現の変化および機能変化を測定した。
- (4) 生体において、尿漏れを確認するために、腎臓全体における水分量、電解質含有量の変化を測定した。
- (5) 既に一定の条件において AKI 治療に対して、一定の効果があると信じられている薬物(ナトリウム利尿ペプチド:

ANP) が、尿管メカニズムにより保護効果を発揮するかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 全身性炎症と局所における乏尿の関係を検討した。Clodronate liposome を投与することで、食細胞の死滅を図った。低用量にて、脾臓 F4/80 陽性細胞の 80%以上を死滅させることができたが、この条件下では、AKI は増悪した。一方で、高用量の clodronate liposome を投与することで脾臓 F4/80 陽性細胞のほぼ全てを死滅させた群では、AKI の顕著な改善が確認できた。Clodronate liposome は腎臓における resident macrophage の数には影響しないため、この実験により得られた成果は、AKI への脾臓マクロファージによる双方向調節を示すものだと考えている。Clodronate liposome は食作用により取り込まれたのちに、当該細胞の細胞死を誘導する。したがって、脾臓の高食活性単球群が AKI に対して保護的に、低食活性群が障害的に機能していると考えられる。マクロファージから分泌されるサイトカイン群による調節を検討する目的で中和抗体による療法を試みたが、単一サイトカインへの処置では芳しい変化は得られなかった。免疫細胞欠失マウス(ヌードマウスおよび NODscid マウス)では、安定した結果が得られず、これらの細胞の寄与は何えたが、非常にフレキシブルなものであることが推察された。

(2) NDRG1 陽性細胞における TLR4 欠失モデルマウスの作製に成功した。このマウスにおいては LPS による乏尿がほぼ解消されており、内毒素症 AKI における乏尿の誘導因子であると考えられた。しかしながら、糸球体過剰が著明に減少する重症度では、NDRG1:TLR4 マウスにおける改善作用は消失していた。に観られた結果は、このマウスにおいて減少していた。したがって、近位尿管における変化が初期主要機序として働き、免疫・炎症系は増悪的あるいは相互保護的な形で働くと考えられる。

(3) LPS により尿管 tight junction の可逆的な破綻を確認した。これは TLR4 阻害により遮断できるため、尿管局所での LPS/TLR4 による乏尿形成メカニズムが確認された。Tight junction 破綻の可逆性は、生体における敗血症性 AKI の生存例における予後の良さを説明できる。

(4) AKI 中のマウスでは、腎臓内水分量の増大、間質内静水圧の上昇が確認できた。これは尿管からの原尿漏出と整合性が獲れる。AKI 中に生じる病変の一つとして腎うっ血があるが、間質中へ漏出した尿は静脈系で回収されるため、過剰な還流により、うっ血が生じると考えられる。

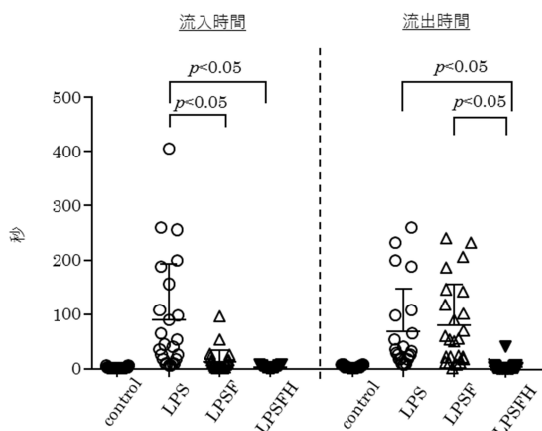


図3. LPSによる近位尿細管への糸球体ろ過液の流入時間および近位尿細管からの流出時間（ラットにおける実験）。LPSにより流入時間（糸球体ろ過速度に反比例）は延長した。蘇生輸液群（LPSF）では流入時間は短縮したものの、流出時間は変化しなかった。心房性ナトリウム利尿ペプチド投与群（LPSFH）では、どちらも短縮していた。

(5) ANP は、AKI に対する作用を期待されている。確固たる臨床エビデンスは少ないものの、一定の用法内であれば治療効果が期待できると考えられているが、メカニズムは不明のままであった。本研究では、LPS による AKI に対して、ANP が治療効果を発揮しうる条件（発揮できない条件）を検証し、その保護効果が尿細管局所のメカニズムによるものかを検証した。

図3に示す通り、蘇生輸液のみではLPSによる糸球体ろ過液の近位尿細管からの流出遅延は改善できなかった。これは、LPSによるAKIが糸球体ろ過速度の低下のみではなく、近位尿細管における尿流速の低下によっても引き起こされていることを示唆する。この尿流速の低下は、近位尿細管からの尿漏出により説明できる。ANP（図中LPSFH群）はこの流出時間の遅延を解消しており、近位尿細管局所における作用が期待できた。そこで、前述のNDRG1陽性細胞における遺伝子欠損技術を用いて、ANPの受容体を近位尿細管で欠損させたところ、図4に示す通り、ANPによる流出時間遅延に対する治療効果は、近位尿細管受容体欠損マウスにおいて、減衰しており、ANPによる保護効果機序の一部として、尿細管局所における保護効果が確認できた。

これらの結果より、敗血症性AKIの初期では尿細管における細胞間隙からの尿漏出により乏尿が生じ、単球はこの作用と相互作用をしているが、完全に依存している結果ではなく、独立した作用があると考えられる。

##### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1件)

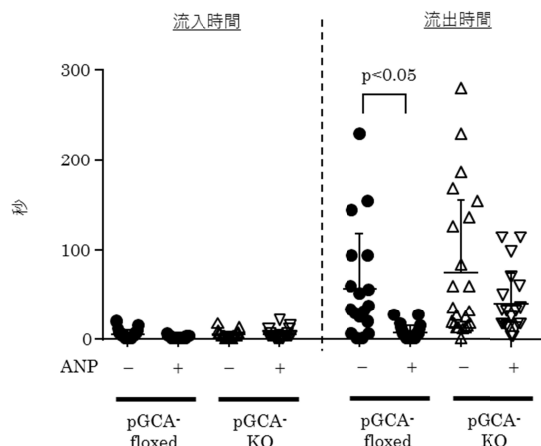


図4. 近位尿細管特異的ナトリウムペプチド受容体欠損マウスにおける、LPSによる近位尿細管への糸球体ろ過液の流入時間および近位尿細管からの流出時間。すべてのマウスは蘇生輸液を受けている。そのため、LPS単独においても流入時間（糸球体ろ過速度に反比例）は正常化されていた。対照マウス（pGCA-floxed）では、LPSにより近位尿細管からの流出時間が延長しており、ナトリウム利尿ペプチド処置（ANP+）により正常化が確認された。一方で、近位尿細管受容体欠損マウスでは、ANP+による効果は限られたものであった。

- (1) Kitamura K, Nakano D, Sawanobori Y, Asaga T, Yokoi H, Yanagita M, Mukoyama M, Yokudome T, Kangawa K, Shirakami G, Nishiyama A. Guanylyl cyclase A in both renal proximal tubular and vascular endothelial cells protects the kidney against acute injury in rodent experimental endotoxemia models. *Anesthesiology*. 2018 (in press) DOI: 10.1097/ALN.0000000000002214. 査読有り。

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) Daisuke Nakano, Renal capillary flow and hypoxia in kidney injury, ISN Frontiers meeting, Kidney disease & cardiovascular disease 2018 (Tokyo).
- (2) 北村裕亮, 中野大介, 西山成, ANPによる急性腎障害改善作用の機序, 第46回日本心臓血管動物質学会 2017年、沖縄
- (3) 北村裕亮, 中野大介, 澤登慶治, 西山成, LPS誘導性急性腎障害においてANPは血管内皮細胞および近位尿細管細胞に作用し改善効果を示す, 第27回日本循環薬理学会 2017年、名古屋
- (4) 北村裕亮, 中野大介, 西山成, Lipopolysaccharide誘発性乏尿に対するカルペリチドの効果, 第39回日本高血圧学会総会 2016年 仙台
- (5) Kitamura H, Nakano D, Yifan Z,

Nishiyama A. Atrial natriuretic peptide improves urine flow at proximal tubules in septic acute kidney injury. 26th Meeting of the International Society of Hypertension Seoul, 2016 (Seoul, South Korea).

〔その他〕

ホームページ等

香川大学医学部薬理学講座ホームページ：

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~yakuri/>

6．研究組織

(1)研究代表者

中野 大介 (Nakano, Daisuke)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524178