

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390225

研究課題名(和文)腎・代謝・免疫調節因子としてのNGALの病態生理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathological role of NGAL as a modulator of kidney function, metabolism and immune system

研究代表者

森 潔 (MORI, KIYOSHI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60343232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：NGAL欠損(KO)マウスはアデニン腎症において早期の腎機能悪化を示した。血中NGALの80%は白血球由来で、尿中NGALは主に腎臓で産生されていた。慢性腎臓病で尿中NGALは一部polyIg receptorや α 2-macroglobulinと結合し、腎病変の重症度と相関した。高脂肪食下でKOマウスは褐色脂肪での熱産生亢進により肥満抵抗性を示した。血液透析患者では血中NGAL低値例は、栄養状態が悪く、重症感染症を起こしやすい傾向を示した。LPS投与時にKOマウスでは脳内炎症、活動性低下、認知機能低下などが軽度であった。特発性肺線維症患者の肺胞洗浄液、肺生検組織内でNGAL発現は亢進していた。

研究成果の概要(英文)：NGAL KO mice exhibited worsening of adenine nephropathy. 80% of blood NGAL was derived from leukocytes, while urinary NGAL was mainly synthesized by the kidney. In chronic kidney disease, urinary NGAL was partly bound to polyIg receptor or α 2-macroglobulin, and showed correlation with severity of renal pathologic changes. Under high fat diet, NGAL KO mice showed resistance against obesity. Hemodialysis patients having low blood NGAL levels showed increased risk to have malnutrition and to develop severe infection. Treatment of WT mice with LPS induced brain inflammation, reduced motor activity and recognition impairment, and these changes were ameliorated in KO mice. NGAL expression was increased in BAL fluid and lung biopsy samples from patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学 臓器関連 代謝 鉄 炎症 感染

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)が腎分化誘導作用(Yang et al. Mol Cell 2002; Mori et al. Semin Cell Dev Biol 2003)・腎保護作用(Mori et al. J Clin Invest 2005)ほか多彩な全身作用をもち(Mori et al. Kidney Int 2007)、急性腎不全の早期診断(Mishra et al. Lancet 2005)および慢性腎臓病の病勢評価(Kuwabara et al. Kidney Int 2009)に有用であることを報告してきた

2. 研究の目的

本研究では

NGALの腎保護作用に関する分子機構の解明

NGALの発現調節及び存在様式に関する検討

肥満・エネルギー代謝における

NGALの意義の解析

NGALによる感染防御作用の検討

中枢神経系におけるNGALの意義の解明

呼吸器系におけるNGALの意義の検討

などについて、他施設との共同研究により、基礎・臨床の両面から集学的研究を推進し、腎-代謝-免疫-神経系連関のコモンレギュレーターとしてのNGALの生理的・病態生理的意義を検討した。

3. 研究の方法

NGAL欠損(KO)マウスは大阪大学の審良静男教授より分与を受けた(Flo et al. Nature 2004)。ヒト及びマウスの血中、尿中NGAL濃度は主にELISA法(BioPort)にて測定した。

4. 研究成果

【NGALの腎保護作用に関する

分子機構の解明】

これまでに腎虚血再灌流障害(Mori et al. J Clin Invest 2005)および腎全摘後の代償性肥大性の慢性腎障害(Viau, Mori, Terzi et al. J Clin Invest 2010)におけるNGALの意義を報告してきた。次に第三のモデルとしてマウスにアデニンを長期投与して慢性腎臓病モデルを作成することにより、NGAL欠損(KO)マウスでは野生型(WT)マウスよりも腎機能の悪化が早いことを見出した。マイクロアレイ及びPCRアレイにより、NGALの新しいシグナル経路の同定を目指して解析を継続している。

【NGALの発現調節及び存在様式に関する検討】

当院血液内科の川端らと共同で造血系悪性腫瘍に対する骨髄移植を受け、治療経過中に末梢血好中球数がゼロとなる前後での血液中・尿中Ngalの推移を検討し、血液中のNGALの80%が白血球由来であることを明らかにした(文献13)。また血液・尿中NGALを大分子量NGALと低分子量NGALに分離したところ、血液のNGALの80%は大分子量型で恐らく腎糸球体による濾過や除去を受けにくいこと、尿中NGALは90%以上小分子量型で主に腎臓で産生されていると考えられることを明らかにした(13)。一方、コロンビア大学のNickolasらと共に、慢性腎臓病患者の尿中で大分子量型のNGALが増加し、質量分析計によりNGALがpolymeric immunoglobulin receptorあるいは2-macroglobulinと結合していること、また慢性腎臓病患者の尿中小分子量型NGAL(NGALモノマー)が糸球体ろ過量低下、尿細管・間質の線維化・萎縮と相関を示し腎病変重症度の指標となることを報告した(1)。以上の研究により、血中・尿中NGALを腎障害のバイオマーカーとして使うことの正当性と限界が明らかとなり、今後の臨床応用に向けて、重要な知見が得られた。

【肥満・エネルギー代謝における

NGALの意義の解析】

当院腎臓内科の柳田らと共同で、肥満症例および肥満マウスの検討を行い、血中および白色脂肪組織中のNGAL発現が増加していた。C57BL/6J純系の遺伝的背景において同腹マウスから得られた産仔を厳密に解析することで、高脂肪食下にて飼育した場合に、NGAL KOマウスではWTマウスよりも摂食量が多いにも関わらず、体重増加が有意に抑制されることを見出した。高脂肪食投与時のみ、KOではWTよりも酸素消費が亢進する一方、運動量には差を認めなかった。褐色脂肪組織におけるUCP1遺伝子発現を検討すると、高脂肪食負荷により発現レベルが亢進する中で、KOはWTよりも有意に高い発現レベルに至ったことより、KOマウスで見られる肥満抵抗性には褐色脂肪における熱産生亢進が関与していると考えられた。その分子機構の解析を継続している。

【NGALによる感染防御作用の検討】

急性腎障害および慢性腎臓病においては、血中NGALが増加し、腎イベントや死亡の予測に有用である。一方で、当院関連施設の慢性維持血液透析患者においては、血中NGALが健常人の10倍程度まで増加するものの、NGAL低値の患者群のほうが、1年以内に入院を要する重症感染症や血清アルブミンの大幅な低下を起こす頻度が高い結果が得られた。血中NGALは鉄キレート作用を有する抗生物質として、あるいは栄養指標として間接的に、感染防御的に働くと考えられた。

【中枢神経系におけるNGALの意義の解明】

韓国のSukらと共同で、マウスにLPSを投与すると、脳内ミクログリアにてNGAL発現が強く誘導された(7)。培養ミクログリア細胞

に対して NGAL を添加すると M1 マクロファージ様の遺伝子発現および NGAL 自身の発現が誘導される一方、STAT6 のリン酸化抑制、M2 マクロファージ様の形質抑制が見られた。WT マウスに LPS を投与すると脳内炎症、活動性低下、認知機能低下などが見られるが、KO マウスではこれらが軽減されており、NGAL はミクログリアにおいて M1 形質を増幅することが明らかとなった(7)。

【呼吸器系における NGAL の意義】

当院呼吸器内科の陳らとの共同研究により呼吸器疾患における NGAL の意義を検討した。閉塞性睡眠時無呼吸症候群患者においては、血中 NGAL は増加しており、夜間無呼吸回数や低酸素時間などの重症度と正の相関を示した(6)。また肺生検組織の健常部位では NGAL は肺胞上皮、マクロファージおよび好中球に軽度発現していたが、特発性肺線維症患者においては蜂の巣状のう胞性病変における気管支化変性を起こした肺胞上皮に高度に発現していた(10)。同疾患の患者では肺胞洗浄液中の NGAL 濃度も増加しており、肺病変の重症度と強い相関を示した。また NGAL を高発現する肺病変においては、組織障害性プロテアーゼである MMP9 の発現も増加しており、NGAL は特発性肺線維症の病態形成に深く関わっている可能性があると考えられた(10)。

以上の研究によって、幅広い生体恒常性維持機構としての NGAL システムの意義の一端を明らかにすることができた。

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 22 件)

- 1) Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, Barasch N, Valle DS, Viltard M, Buchen C, Kupferman S, Carnevali ML, Bennett M, Mattei S, Bovino A, Argentiero L, Magnano A, Devarajan P, Mori K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Allegri L, Barasch J. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int* 82:718-722, 2012. [doi: 10.1038/ki.2012.195]
- 2) S Lee, WH Lee, K Mori, and K Suk. Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell death, migration, and morphology. *J Neurosci Res* 90:540-550, 2012. [doi: 10.1002/jnr.22779]
- 3) T Kuwabara, K Mori,* M Mukoyama, M Kasahara, H Yokoi, Y Saito, Y Ogawa, H

Imamaki, T Kawanishi, A Ishii, K Koga, KP Mori, Y Kato, A Sugawara, and K Nakao (*corresponding author). Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia* 55:2256-2266, 2012.

[doi: 10.1007/s00125-012-2578-1]

4) Y Ogawa, M Mukoyama, H Yokoi, M Kasahara, K Mori, Y Kato, T Kuwabara, H Imamaki, T Kawanishi, K Koga, A Ishii, T Tokudome, I Kishimoto, A Sugawara, K Nakao. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury in mice.

J Am Soc Nephrol 23:1198-1209, 2012.

[doi: 10.1681/ASN.2011100985]

5) H Yokoi, M Kasahara, K Mori, Y Ogawa, T Kuwabara, H Imamaki, T Kawanishi, K Koga, A Ishii, Y Kato, KP Mori, N Toda, S Ohno, H Muramatsu, T Muramatsu, A Sugawara, M Mukoyama, and K Nakao. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 81:160-169, 2012.

[doi: 10.1038/ki.2011.305]

6) Murase K, Mori K, Yoshimura C, Aihara K, Chihara Y, Azuma M, Harada Y, Toyama Y, Tanizawa K, Handa T, Hitomi T, Oga T, Mishima M, Chin K. Association between plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin level and obstructive sleep apnea or nocturnal intermittent hypoxia. *PLoS One* 8:e54184, 2013. [doi: 10.1371/journal.pone.0054184]

7) Jang E, Lee S, Kim JH, Kim JH, Seo JW, Lee WH, Mori K, Nakao K, Suk K. Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB J* 27:1176-1190, 2013 [doi: 10.1096/fj.12-222257]

8) Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Toda N, Yamada R, Namoto S, Yamamoto T,

Seki N, Souma N, Yamaguchi T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K Peritoneal fibrosis and high transport are induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit Dial Int* 33:143-154, 2013.

[doi: 10.3747/pdi.2011.00033]

9) Furuichi K1, Shimizu M, Toyama T, Koya D, Koshino Y, Abe H, Mori K, Satoh H, Imanishi M, Iwano M, Yamauchi H, Kusano E, Fujimoto S, Suzuki Y, Okuda S, Kitagawa K, Iwata Y, Kaneko S, Nishi S, Yokoyama H, Ueda Y, Haneda M, Makino H, Wada T; Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study: study design, methods, and implementation.

Clin Exp Nephrol 17:819-826, 2013.

[doi: 10.1007/s10157-013-0778-8]

10) Ikezoe K, Handa T, Mori K, Watanabe K, Tanizawa K, Aihara K, Tsuruyama T, Miyagawa-Hayashino A, Sokai A, Kubo T, Muro S, Nagai S, Hirai T, Chin K, Mishima M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in idiopathic pulmonary fibrosis.

Eur Respir J 43:1807-1809, 2014.

[doi: 10.1183/09031936.00192613]

11) Kuwabara T, Mori K,* Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. *PloS One* 9:e88942. 2014.

[doi: 10.1371/journal.pone.0088942]

12) Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T.

Adrenomedullin-RAMP2 System Suppresses ER Stress-Induced Tubule Cell Death and Is Involved in Kidney Protection.

PloS One 9:e87667, 2014.

[doi: 10.1371/journal.pone.0087667]

13) Kanda J, Mori K,* Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions.

Clin Exp Nephrol, in press.

14) Kuwabara T, Mori K,* Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipototoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy.

Clin Exp Nephrol, in press.

15) Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K. Do statins play a role in renoprotection? *Clin Exp Nephrol*, in press.

16) 森 潔、中尾一和 . 急性腎障害のバイオマーカー . 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013 pp. 295-298, 2011. (南江堂)

17) 森 潔、向山政志、笠原正登、中尾一和 . 新規バイオマーカーから見た尿細管間質性腎障害 . 日本腎臓学会誌 53: 596-599, 2011. (日本腎臓学会)

18) 森 潔、中尾一和. AKIの発症予測. AKI(急性腎障害)のすべて 基礎から臨床までの最新知見 22-27, 2012. (南江堂)

19) 森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、中尾一和. 最新の疾患バイオマーカー研究 より適切な診療を目指して : 慢性腎臓病(CKD). 日本臨牀 70:864-868, 2012. (日本臨牀社)

20) 森 潔、栗原孝成、横井秀基、笠原

正登、向山政志、中尾一和. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin による病態解析.

臨床検査 57: 617-622, 2013. (医学書院)

21) 森 潔、栗原孝成、横井秀基、笠原正登、向山政志、中尾一和. Ngal の病態生理的意義. **Annual Review 腎臓** 2013 146-149, 2013. (中外医学社)

22) 森 潔. 腎臓病のすべて: 腎障害のバイオマーカーの進歩と展望. **医学のあゆみ** 249: 997-1002, 2014. (医歯薬出版株式会社)

[学会発表](計 24 件)

1) K Mori, J Kanda, M Mukoyama, H Kawabata, M Kasahara, H Yokoi, T Kuwabara and K Nakao. The kidney and neutrophils are the major sources of acute kidney injury biomarker NGAL. **World Congress of Nephrology**. April 8-12, 2011. Vancouver, Canada.

2) K Mori, M Mukoyama, M Kasahara, H Yokoi, T Kuwabara, H Imamaki, T Kawanishi, A Ishii, K Koga, KP Mori, Y Kato, A Sugawara and K Nakao. Incomplete tubular compensation model for albuminuria in diabetes. **World Congress of Nephrology**. April 8-12, 2011. Vancouver, Canada.

3) T Kuwabara, K Mori (2nd author) et al. Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling. **World Congress of Nephrology**. April 8-12, 2011. Vancouver, Canada.

4) H Yokoi, K Mori (4th) et al. Pleiotrophin causes peritoneal inflammation and mesothelial cell proliferation in a mouse model of peritoneal fibrosis. **World Congress of Nephrology**. 2011 (同上)

5) T Kawanishi, K Mori (2nd) et al. Urinary level of Ngal is superior to urinary protein in prediction of chronic kidney disease progression. **Annual Meeting of American Society of Nephrology**. Nov. 10-13, 2011. Philadelphia, PA

6) H Ujike, K Mori (4th) et al. Analysis of acute kidney injury and its prediction by urinary biomarkers in adult Japanese ICU patients. **Annual Meeting of American Society of**

Nephrology. 2011 (同上)

7) T Kuwabara, K Mori (2nd) et al. Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages. **Annual Meeting of American Society of Nephrology**. 2011.

8) Y Kato, K Mori (5th) et al. Blockade of p38 MAPK pathway ameliorates aldosterone-induced renal injury in guanylyl cyclase-A deficient mice. **Annual Meeting of American Society of Nephrology**. 2011.

9) 【招聘講演】K Mori, M Mukoyama, J Barasch and K Nakao. Lessons from analysis of a single urinary biomarker, Ngal. **The 9th Japan Human Proteome Conference**. July 28-30, 2011. Niigata, Japan.

10) T Kuwabara, K Mori (2nd) et al. Macrophage-mediated glucolipotoxicity contributes to progression of diabetic nephropathy through MRP8/TLR4 signaling. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, Nov. 1-4, 2012. San Diego, CA.

11) K Koga, K Mori (4th) et al. Analyses of microRNAs targeting CTGF in peritoneal fibrosis mouse model. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, 2012. (同上)

12) K Koga, K Mori (4th) et al. microRNA-26a is upregulated in glomeruli of diabetic mice and attenuates TGFβ1-induced extracellular matrix expression in podocytes by inhibiting both CTGF and SMAD2. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, 2012.

13) N Toda, K Mori (4th), Inducible CTGF (CCN2) knockout mice attenuates anti-glomerular basement membrane nephritis. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, 2012.

14) KP Mori, K Mori (2nd) et al. Acute disruption of megalin expression in renal cortex reveals compensatory reabsorption capacity of low molecular weight proteins in S3 segment of proximal tubules and collecting ducts. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**.

15) KP Mori, K Mori (2nd) et al. Alteration of renal lipid deposition and gene expression induced by fasting and high-fat diet feeding. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, 2012.

16) Y Kato, K Mori (5th) et al. p38 MAP kinase mediates aldosterone-induced podocyte injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice. **The 45th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**, 2012.

17) KP Mori, K Mori (2nd) et al. Megalin-independent reabsorption of low molecular weight proteins at collecting ducts revealed by drug-inducible megalin knockout mice. **World Congress of Nephrology**. May 31-June 4, 2013. Hong Kong, China

18) N Toda, K Mori (4th) et al. Systemic deletion of CTGF ameliorates anti-glomerular basement membrane nephritis with reduction of macrophage infiltration. **The 46th Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology**. Nov. 7-10, 2013. Atlanta, GA.

19)【招聘講演】森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、中尾一和。AKIとCKDのバイオマーカー。第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15 - 17日、横浜

20)【プレナリー演題】川西智子、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、栗原孝成、田中佐智子、上嶋健治、菅原 照、中尾一和。尿中 Ngal と尿蛋白による慢性腎臓病患者の短期的腎予後予測。第109回日本内科学会講演会 2012年4月13 - 15日、京都

21) 石井 輝、森 潔、栗原孝成、川西智子、今牧博貴、笠原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原 照、向山政志、中尾一和。肥満における Ngalの脂肪蓄積作用。第33回日本肥満学会。2012年10月11-12日、京都。

22)【招聘講演】森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、中尾一和。尿中バイオマーカーの新知見。第41回日本腎臓学会西部学術大会 2011年9月30日 - 10月1日、徳島

23)【招聘講演】森 潔、栗原孝成、横井秀基、笠原正登、向山政志。糖尿病性腎症の成因における糖・脂肪毒性の分子メカニズ

ム。第43回日本腎臓学会西部学術大会。2013年10月11-12日、松山

24) 石井 輝、今牧博貴、栗原孝成、笠原正登、横井秀基、古賀健一、森慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原 照、柳田素子、中尾一和、向山政志、森 潔。分泌シグナル Ngal の糖脂質代謝における意義。第57回日本糖尿病学会年次学術集会。2014年5月22-24日、大阪

〔図書〕(計3件)

1) 森 潔。糸球体の構造・機能と糸球体過剰濾過。病態から学ぶ新腎臓内科学。6-8, 2011。(診断と治療社)

2) 森 潔。急性腎不全・急性腎障害。病態から学ぶ新腎臓内科学。62-66, 2011。(診断と治療社)

3) 森 潔。心腎連関と内分泌代謝。最新内分泌代謝学。341-342, 2013。(診断と治療社)

〔産業財産権〕
特記事項なし

〔その他〕
ホームページ
京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター・TMKプロジェクト
<http://www.tmk.med.kyoto-u.ac.jp/mori.html>
京都大学教育研究活動データベース
<http://www.tmk.med.kyoto-u.ac.jp/mori.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 潔 (MORI KIYOSHI)
京都大学大学院医学研究科・準教授
研究者番号：60343232

(2) 連携研究者

柳田 素子 (YANAGITA MOTOKO)
京都大学大学院医学研究科・教授
研究者番号：70378769

川端 浩 (KAWABATA HIROSHI)
京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号：10329401