

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18939

研究課題名(和文)薬物による尿細管間質性腎炎の発症機序解明

研究課題名(英文)Mechanisms underlying drug-induced tubulointerstitial nephritis

研究代表者

中川 俊作(Nakagawa, Shunsaku)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50721916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物による腎尿細管間質性腎炎は、尿細管間質における炎症を起点として、腎実質の障害とそれに続く腎機能の低下や貧血など全身性の症状を惹起し得る。しかし、その発症機序はほとんど明らかにされておらず、科学的根拠に基づいた予防法及び治療法は確立されていない。そこで本研究では、腎臓外の要因が尿細管間質性腎炎発症に関与しているという概念をもとに、薬物による尿細管間質性腎炎の発症機序解明を目標とした。抗菌薬と腸内細菌叢に注目した解析から、薬物による尿細管間質性腎炎の発症には、腎外の要因が関与することを実証する結果が得られた。また、腎外の要因として、腸内細菌叢の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced renal tubulointerstitial nephritis is characterized by inflammation in renal interstitium, which can cause chronic renal dysfunction and anemia. However, the mechanisms underlying pathogenesis of tubulointerstitial nephritis remained unclear. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of drug-induced tubulointerstitial nephritis based on the concept that factors outside the kidneys are involved in the development of tubulointerstitial nephritis. Analysis focusing on antimicrobial drugs and intestinal bacterial flora demonstrated that the intestinal flora is involved in the development of drug-induced tubulointerstitial nephritis.

研究分野：医療薬学

キーワード：尿細管間質性腎炎 抗菌薬 NSAIDs 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

薬物による腎尿細管間質性腎炎は、尿細管間質における炎症を起点として、腎実質の障害とそれに続く腎機能の低下や貧血など全身性の症状を惹起し得る。しかし、その発症機序はほとんど明らかにされておらず、科学的根拠に基づいた予防法及び治療法は確立されていない。そこで本研究では、腎毛細血管透過性の増大に伴う活性化T細胞の腎への浸潤が尿細管間質性腎炎発症の主要因であるという概念をもとに、薬物による尿細管間質性腎炎の発症機序解明を目標とした。

2. 研究の目的

薬物治療の多様化に伴い、薬剤性腎障害の発症頻度が年々上昇している。入院中における薬剤性腎障害の発症は入院患者数全体の約5%に見られ、腎障害発症後は50%以上が進行性の腎機能低下を来すとされる。薬物による尿細管間質性腎炎 (Tubulointerstitial Nephritis) の発症は、腎臓に関連した副作用としては頻度が低いものの、重篤な副作用として認識される。その背景として、尿細管間質性腎炎は尿細管周囲の間質における炎症を起点として発症するが、初期症状からは腎障害を発見・診断することが困難であり、慢性化や全身性の副作用を惹起しやすいことが挙げられる。尿細管間質性腎炎の発症は抗炎症薬や抗生物質などによって引き起こされることが多いが、これらの薬物に共通する性質は見出されておらず、その機序としてアレルギー様のメカニズムが示唆されるに留まっている。さらに、薬物による尿細管間質性腎炎を再現する実験モデルは存在せず、詳細な機序は不明なため、尿細管間質性腎炎を予防・治療するための科学的基盤は未整備なままである。一方、医薬品医療機器総合機構より公開されている副作用報告データベースによると、薬物による尿細管間質性腎炎の報告数は近年も増加傾向にあることが判り、その機序を解明し、臨床へ応用することが重要な研究課題と位置づけられる。そこで本研究では、「薬物による尿細管間質性腎炎発症の主要因は腎血管透過性の増大と全身性の炎症の存在である」という考えのもと、以下に記述する研究計画の立案に至った。

我々は以前に、腎毒性を有する白金系抗がん剤シスプラチンをラットに投与し病態を解析したところ、臨床用量のシスプラチン投与後は一時的に腎排泄能の低下と炎症の促進が観察されることを明らかにした。さらに、シスプラチン投与後にみられる腎組織中の炎症は腎毛細血管透過性の増大に起因することを見出した。また、本計画に先立つ予備検討として、尿細管間質性腎炎の副作用報告が多いロキソプロフェン (非ステロイド系抗炎症薬のひとつ) を用いた検討を行ったところ、ロキソプロフェン投与によっても腎血管

透過性の増大が引き起こされることを確認している。

最近の研究報告から、腎障害に伴う炎症には腎外由来のリンパ球または白血球が関与すること (Zhang MZ, et al. *J Clin Invest.* 2012; 122: 4519-4532)、このような細胞の腎への浸潤には腎由来の液性因子が関与することが示されており (Li L, et al. *Kidney Int.* 2008; 74: 1526-1537)、本仮説を支持するものと考えられた。

一方、腎機能低下患者由来の腎生陰組織を用いたマイクロアレイ解析から、尿細管間質性腎炎を発症した症例の腎組織では、IgA腎症や糖尿病性腎症など他の腎疾患患者の腎組織と比較して、サイトカインのひとつであるIL17やケモカイン受容体CCR6のmRNA発現量が著しく高いことを見出した。IL17やCCR6はT細胞のうち、炎症に関わるTh17のマーカー遺伝子であること (Lim HW, et al. *J Immunol.* 2008; 180: 122-129) 並びに、健全な腎臓では常在性のT細胞は存在せず腎障害に伴って浸潤が認められること (Friedewald JJ and Rabb H. *Kidney Int.* 2004; 66: 486-491) がよく知られている。そこで、以下の仮説を考えた。

【仮説】

薬物によって腎血管透過性が増大した際に、循環血中から尿細管間質へと活性化T細胞が浸潤すると、尿細管間質性腎炎の発症につながる。

この仮説を支持する知見として、先に述べた副作用報告データベースを用いた解析から、ロキソプロフェンによって尿細管間質性腎炎が発症した症例では、炎症疾患を背景として有する割合が高いことを見出した。すなわち、血中において活性化T細胞が存在した場合には尿細管間質性腎炎が発症しやすいことが示唆された。本研究課題では上記の仮説を検証し、薬物による尿細管間質性腎炎の発症機序解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では薬物による尿細管間質性腎炎の発症機序解明を目的として、以下の計画を進めた。

A. 薬物による尿細管間質性腎炎を再現する実験モデル動物の確立

我々は、薬物による尿細管間質性腎炎の発症には、腎毛細血管透過性の増大と活性化T細胞の腎への浸潤が関与することを想定した。そこで、ロキソプロフェンをモデル薬物として用い、活性化T細胞との同時処置により、マウスにおいて尿細管間質性腎炎を再現

する動物モデル作製を目指した。

A-1. ロキソプロフェンが腎間質への白血球およびリンパ球の浸潤へ及ぼす影響の評価

本計画に先立って行った予備検討では、ロキソプロフェンをマウスに経口投与し、血清アルブミンに結合する色素を用いて腎臓への蓄積量を評価した。その結果、ロキソプロフェンを投与開始してから1週間後のマウスでは、対照群と比較して、腎臓への色素蓄積量が有意に上昇することが判明した。さらに、上述した副作用報告データベースを調査した結果、ロキソプロフェンによる尿細管間質性腎炎の症例のほとんどは、投与開始から2週間以内に発症したとされていた。これらのことから、マウスを用いて薬物による腎炎の発症を再現するにあたり、投与開始から2週間以内を検討期間とした。また、本研究では尿細管間質性腎炎発症におけるT細胞の役割に注目しているが、計画の中で行う実験では、骨髄から誘導したマクロファージや樹状細胞を用いて、比較検討を行った。

A-2. 症状の可逆性や薬物曝露量への依存性に関する解析

一般に、薬物による尿細管間質性腎炎は、早期に発見し原因となる薬物を中止することによって、回復可能と考えられている。そこで、薬物とT細胞の処置によって尿細管間質性腎炎を引き起こした際に、症状の可逆性を検証した。また、種々曝露量のロキソプロフェンを用いることで、尿細管間質性腎炎発症の用量依存性を解析した。

B. 尿細管間質性腎炎を引き起こす薬物が有する特徴の同定

シスプラチンによる急性腎障害は、尿細管間質における炎症を惹起し得るものの、その主体は単球の増殖によるものであり、T細胞の浸潤を伴わない。このように、尿細管間質性腎炎の発症には薬物側の要因が強く関与することが示唆される。そこで、尿細管間質性腎炎を引き起こす薬物の性質を、特に、T細胞への影響に注目して探索した。

腎機能低下を惹起しやすい代表的な薬物であるシスプラチンやメトトレキサートは、メサラジンやNSAIDsのような抗炎症薬と比較して、尿細管間質性腎炎の発症頻度は低いことが明らかにされている。さらに、副作用報告を解析した結果、NSAIDsの中でもシクロオキシゲナーゼ COX-2 に対して選択性を有するセレコキシブなどの薬物は、腎炎の発症リスクが低い可能性を見出した。そこで、抗炎症薬や COX 阻害能といった薬物の性質に着目して、種々薬物による尿細管間質性腎炎の起こりやすさの違いを解析した。

C. 薬剤による尿細管間質性腎炎に関する実態調査

薬物による尿細管間質性腎炎に関して、研究課題としてこれまで顧みられることが乏しかった背景として、その発症頻度が低いことに加えて、臨床における実態が不明であったことも一因として考えられる。しかし、特定の条件下では尿細管間質性腎炎の発症頻度は高いことも予想され、各薬物のリスクや背景因子との関連を明らかにすることを目的として実態調査に着手した。

【研究が当初計画通りに進まなかった時の対応】

薬物による尿細管間質性腎炎の発症リスクは、炎症性腸疾患や上気道の炎症を有する場合に高いことが知られている（厚生労働省、重篤副作用疾患別対応マニュアル、間質性腎炎）。そこで、当初計画の中で示した薬物とT細胞の同時処置による動物モデルが作製できなかった場合は、炎症性腸疾患のモデル動物に対してロキソプロフェンやその他の薬物を投与し、腎への影響を観察した。このことによって、腎外における炎症の存在が尿細管間質性腎炎の発症に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

はじめに、NSAIDsが関連する腎障害の実験モデルとして、ロキソプロフェン及びインドメタシンをマウスに経口投与し、腎臓への影響を観察した。しかし、これらのNSAIDsを8週間投与しても血清クレチニン値など腎機能への明らかな影響は認められなかった。そこで、腎臓外における環境変化と腎実質の障害の両方が組み合わさることで尿細管間質性腎炎が生じると考え、NSAIDsを経口投与したマウスに腎毒性物質であるアリストロキア酸を腹腔内投与し、腎機能の変化を観察した。その結果、アリストロキア酸処置後においてもNSAIDsによる腎臓への有意な影響は認められなかった。

そこで、腸内環境の変化を引き起こす薬物として抗菌薬に注目し、抗菌薬の経口投与による影響について検討を行った。その背景は以下の通りである。臨床上認められるTINの原因薬物として抗菌薬が挙げられ、中でもセフェム系抗菌薬やフルオロキノロン系抗菌薬などの経口抗菌薬投与後に発症することが知られている。抗菌薬によるTINの発症機序として、尿細管上皮細胞への直接的障害や薬物に対するアレルギー反応を介する障害が示唆されている。しかし動物を用いたこれらの抗菌薬の毒性試験では臨床用量において腎障害がほとんど発現しないため、抗菌薬によるTINの発症は間接的な機序が関与すると考えられた。一方で近年、腎疾患の発症における腸内細菌の関与が明らかにされた。無菌環境下において

飼育されたマウスでは、通常環境下で飼育されたマウスと比較して、実験的に誘導された糸球体腎炎の重篤度が軽減されることが示されている。しかし、腸内細菌をもたないマウスや抗菌薬を経口投与したマウスでは、アデニンや腎虚血再灌流による急性腎障害が重篤になることも報告されている。このように、報告によって腸内細菌の腎障害への関与度合は異なるが、抗菌薬による腸内細菌叢の変化は腎機能に影響を及ぼす可能性が十分に考えられた。

抗菌薬であるバンコマイシン、アンピシリン、セファゾリン、ネオマイシン及びレボフロキサシンをマウスに経口投与し、糞便中の腸内細菌叢に及ぼす影響を評価したところ、糞便中の総細菌数は大きく変化しなかった。しかし、3剤（バンコマイシン、アンピシリン及びレボフロキサシン）の同時投与によりその数が著明に減少した。一方、腸内細菌個々の相対存在数に注目した場合には、抗菌薬が腸内細菌叢に及ぼす影響はその種類によって大きく異なった。各腸内細菌の相対存在数によって抗菌薬を比較したところ、レボフロキサシンとネオマイシン、アンピシリンとセファゾリンがそれぞれ類似したプロファイルを示すことが明らかとなった。以上より、2週間の抗菌薬経口投与により腸内細菌叢は顕著に変化し、そのプロファイルは抗菌薬の種類によって大きく異なることが確認された。

抗菌薬の投与を2週間行った後にアリストロキア酸を腹腔内投与し、TINを誘発した。アリストロキア酸投与から1週間後の腎臓では、正常腎と比較して、腎線維化マーカータンパク質 α -SMA 発現量が増加し、線維化の進展が観察された。そこで、抗菌薬の投与による α -SMA 発現への影響を観察した。アリストロキア酸を投与した各群のマウスの腎臓は正常腎と比較して α -SMA 発現量の有意な増加を認めた。さらに、アリストロキア酸投与マウスの中で、レボフロキサシン及びネオマイシンを投与したマウスの腎臓では、滅菌水のみを投与したマウスの腎臓と比較して、 α -SMA 発現量の有意な増加を認めた。

アリストロキア酸の投与は腎臓へのリンパ球浸潤を惹起し、CD3 陽性細胞数の増加が観察された。抗菌薬が腎臓への CD3 陽性細胞の浸潤に及ぼす影響を評価したところ、アリストロキア酸投与マウスの中で、滅菌水、レボフロキサシン、ネオマイシン及びバンコマイシンを投与したマウスの腎臓では、正常腎と比較して、アリストロキア酸投与から1週間後の腎臓内 CD3 陽性細胞数を有意に増加させた。一方、アンピシリン、セファゾリン及び3剤投与（バンコマイシン、アンピシリン及びレボフロキサシン）を投与したマウスの腎臓では、正常腎と比較して、アリストロキア酸投与から1週間後において腎臓内 CD3 陽性細胞数の有意な上昇が観察されなかつ

た。

一部の腸内細菌は短鎖脂肪酸を代謝産生するが、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸は急性腎障害の重篤化を防ぐことが報告されている。そこで、抗菌薬投与後における糞便中短鎖脂肪酸含有量を定量した。その結果、レボフロキサシン単剤の投与により糞便中における酢酸が、バンコマイシン、アンピシリン及びレボフロキサシンの同時投与により、糞便中における酢酸及び酪酸含有量は有意に低下した。

本研究では、アリストロキア酸により誘導したマウス TIN モデルを用い、抗菌薬投与による腸内細菌叢の変化と TIN 重篤度との関連性を調べた。その結果、 α -SMA 発現量で表される線維化や CD3 陽性細胞数で表されるリンパ球浸潤の程度に及ぼす影響は、抗菌薬の種類によって異なることが明らかとなった。レボフロキサシン及びネオマイシンは TIN の重篤度を高める影響を示し、アンピシリンやセファゾリンは腎保護的な影響を示した。また、これらの結果は各抗菌薬による腸内細菌叢のプロファイルと相関していることから、抗菌薬は腸内細菌叢の変化を介して TIN の進展に関与することが示唆された。一方、バンコマイシン、アンピシリン及びレボフロキサシンの同時投与は TIN の重篤度に影響を及ぼさなかった。以上のことから、抗菌薬による腸内細菌叢の変化が TIN に及ぼす影響を次のように考察した。腸内細菌叢には腎保護の役割を有する細菌と腎障害の進展に寄与する細菌が含まれていることが示唆される。また、レボフロキサシンは前者の細菌に対して、アンピシリンは後者の細菌に対して選択的に働き、その生存数を減少させることにより、腎臓に対して異なった作用を示す可能性がある。

腸内細菌によって産生された短鎖脂肪酸は制御性 T 細胞の分化誘導を制御することが知られており、その含有量の変化は全身の免疫反応に影響を及ぼすことが示唆されている。これまでの報告において、糞便中の短鎖脂肪酸は腎障害の進展に関与することが示されている。無菌環境下でマウスを飼育することにより、腸内における短鎖脂肪酸含有量低下とアデニンによる腎障害の重篤化につながることを報告されている。また、酢酸やプロピオン酸の前処置により、虚血再灌流障害が軽減されることも明らかにされている。本研究においても、バンコマイシン、アンピシリン及びレボフロキサシンの同時投与により腸内における酢酸、及び酪酸含有量の有意な低下が観察された。さらに、レボフロキサシンの単独投与によっても腸内における酢酸含有量の有意な低下を確認している。したがって、抗菌薬の経口投与に伴ってアリストロキア酸誘発性 TIN の重篤化が変化した機序の一部に腸内における短鎖脂肪酸が関与

している可能性がある。

【結論】

薬物による尿細管間質性腎炎の発症には、腎外の要因が関与することを実証する結果が得られた。また、腎外の要因として、腸内細菌叢の重要性が示唆された。

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2件)

Leaf IA, Nakagawa S, Johnson BG, Cha JJ, Mittelsteadt K, Guckian KM, Gomez IG, Altemeier WA, Duffield JS, Pericyte MyD88 and IRAK4 control inflammatory and fibrotic responses to tissue injury, J Clin Invest, 査読有、127(1), 2017, 321-334.
DOI: 10.1172/JCI87532.

中川 俊作、慢性腎臓病に伴う尿細管障害及び間質線維化のバイオマーカーの同定、Yakugaku Zasshi, 査読有、137, 2017, 1355-1360
DOI: 10.1248/yakushi.17-00150

〔学会発表〕(計2件)

高尾 翔太、中川 俊作、栗村 万由子、中村美沙子、大谷 祐基、大村 友博、今井 哲司、米澤 淳、中川 貴之、松原 和夫、薬毒物による間質性腎炎の発症における腸内細菌叢の関与、医療薬学フォーラム、2017年7月1日

Mayuko Kurimura, Shunsaku Nakagawa, Shota Takao, Yuki Okuda, Misako Nakamura, Yuki Otani, Tomohiro Omura, Satoshi Imai, Atsushi Yonezawa, Takayuki Nakagawa, Kazuo Matsubara, Long-term renal outcomes of cisplatin-induced nephropathy, ISN Frontiers Meetings, 2018年2月23日

6．研究組織

(1)研究代表者

中川 俊作 (Nakagawa Shunsaku)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50721916