

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790795

研究課題名（和文） 敗血症性急性腎不全におけるL型脂肪酸結合蛋白の役割

研究課題名（英文） L-type fatty acid-binding protein in septic acute kidney injury

研究代表者

土井 研人 (DOI KENT)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80505892

研究成果の概要（和文）：

敗血症において生じる多臓器不全、とりわけ急性腎不全を合併すると高い死亡率を示す。本研究では、敗血症性急性腎不全の早期診断を可能とする新規バイオマーカーとしてL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の有用性について、マウス敗血症モデルを作成することで検証した。その結果、尿中L-FABPが血清クレアチニン、尿中NAGよりも早期かつ正確に敗血症性急性腎不全の検出および予後予測を行うことが可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Multiple organ failure, especially acute renal failure, complicated with sepsis shows high mortality rate. This study evaluated the utility of urinary L-type fatty acid-binding protein (L-FABP) for early diagnosis of septic acute renal failure using mouse sepsis models. Results of this study demonstrated urinary L-FABP could detect septic acute renal failure earlier than serum creatinine and urinary NAG with higher accuracy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・敗血症性急性腎不全

## 1. 研究開始当初の背景

集中治療室(ICU)において敗血症は頻繁に発生し、しかも医療技術の進歩にもかかわらず依然として死に至る重篤な病態である(NEJM 348: 1546, 2003)。とりわけ敗血症による急性腎不全(acute kidney injury; AKI)を合併するとその死亡率はきわめて高くなることが知られており、敗血症早期の段階でAKIを呈した症例の死亡率は他の群と比較して有意に高いことが明らかにされている

(Crit Care Med 28: 3405, 2000)。したがって、敗血症の診療において腎機能障害を早期に検出し腎不全を回避すべく治療を開始することは、敗血症の予後を改善するうえで極めて重要であるが、依然として血清クレアチニンおよび尿量といった、感度および時間的変動に乏しく、数十年来用いられている指標を用いてAKIの診断がなされているのが現状であった。新規バイオマーカーにより早期かつ正確な敗血症および敗血症性AKIの診

断が可能となれば、敗血症の治療成績の改善のみならず、抗菌薬、昇圧薬以外の敗血症に対する新規薬剤の開発が進むと期待されていた。

研究代表者のグループは、ヒトおよび動物モデルにおいて新規バイオマーカーである尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-type fatty acid-binding protein; L-FABP) が、腎移植や心臓手術に関連した虚血性腎障害、シスプラチン、NSAIDs などの薬剤による腎障害を鋭敏に検出できることを報告してきた (J Am Soc Nephrol 18: 2894, 2007; Kidney Int 73: 465, 2008; Nephron 108: e19, 2008)。腎臓に対する虚血・低酸素ストレスに対して近位尿細管における L-FABP の発現が亢進し尿中に放出されることが主なメカニズムであると考えられた。さらに、ヒト L-FABP トランスジェニックマウスは野生型に比べて腎障害抵抗性であるといった知見が得られていた。しかし、L-FABP の過剰発現が臓器障害に保護的に作用する機序について、その詳細は明らかにされておらず、L-FABP が有用なバイオマーカーであるのみならず、AKI に対する治療のターゲットとなる可能性がこれまで示されていたものの、薬剤開発への応用については未だ十分に検討がなされていない状況であった。

## 2. 研究の目的

ヒト L-FABP トランスジェニックマウスに対して敗血症を惹起し、L-FABP の急性腎不全 (acute kidney injury; AKI) を中心とした臓器不全の早期診断バイオマーカーとしての有用性を評価し、さらに敗血症における L-FABP の臓器保護作用を探索するとともに、敗血症に対する新たな薬剤・治療戦略について検討を行うことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

齧歯類では腎臓に L-FABP 発現がなく欠損動物と同等であるため、ヒト L-FABP トランスジェニックマウスを用いて敗血症モデルを作成し、血液あるいは尿中に排泄されるヒト L-FABP を高性能 ELISA にて解析した。このトランスジェニックマウスは、定常状態において腎臓、肝臓、腸管にヒト L-FABP を発現していることが蛋白レベルで確認されている (Am J Pathol 165: 1243, 2004)。

敗血症モデルとしては Cecal ligation and puncture (CLP; 盲腸結紮穿刺) およびリポポリサッカライド (LPS) 投与モデルを用いた。CLP の手法を用いてマウスに敗血症を惹起し、術後 6 時間より広域抗生物質と生理食塩水による補液を行うことでよりヒトの敗血症に近い病態を再現することができ

(Kidney Int 273: 1266, 2008)、さらに、CLP にて結紮する盲腸の長さ及び穿刺に使

用する針のサイズや穿刺回数などを変更することで、惹起する敗血症の重症度をコントロールした。CLP モデルに加えて LPS 投与による敗血症モデルの確立も試み、腹腔内投与および気道内投与による敗血症の惹起によっても尿中 L-FABP が投与量に比例した濃度上昇を示すことを確認した。

同時にヒト L-FABP トランスジェニックマウスと野生型マウスとの敗血症に対する抵抗性について比較検討を行った。これまでの検討でヒト L-FABP トランスジェニックマウスは腎障害抵抗性であるという知見が虚血再灌流障害やシスプラチン投与モデルにおいて認められていた (J Am Soc Nephrol 18: 2894, 2007, Kidney Int 72: 348, 2007)。また、L-FABP の保護的作用のメカニズムとして酸化ストレス、脂質過酸化を軽減することが示されている。CLP による敗血症に対してトランスジェニックマウスは野生型より抵抗性であるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

CLPモデルによる敗血症をヒト L-FABP トランスジェニックマウスに惹起し、術後早期 (0、3、6 時間) から尿中 L-FABP レベルが上昇することを確認するとともに、重症度に応じた尿中 L-FABP レベルが観察された。同様の所見が LPS 投与モデルにおいても得られた。また、尿中 L-FABP のこれら敗血症モデルにおける挙動は、血中尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン、尿中 NAG よりも鋭敏かつ高い精度で重症度を反映することも証明した (図 1 CLP モデル、図 2 LPS モデル)。

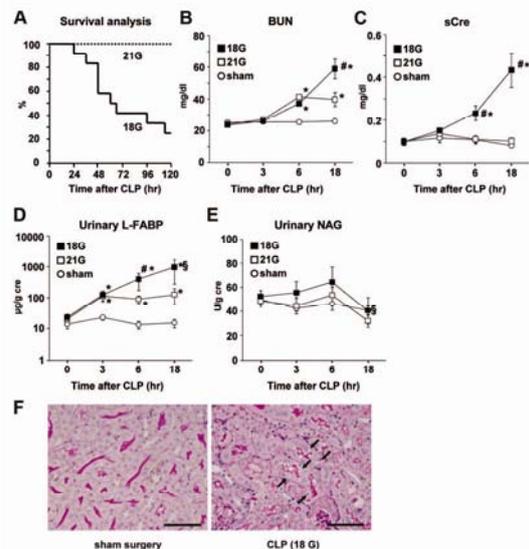


図 1 CLP モデルにおける検討

(A) 生存曲線 (21G 針; 軽症敗血症, 18G 針; 重症敗血症) (B) BUN (C) 血清クレアチニン (D) 尿中 L-FABP (E) 尿中 NAG (F) 腎病理組織

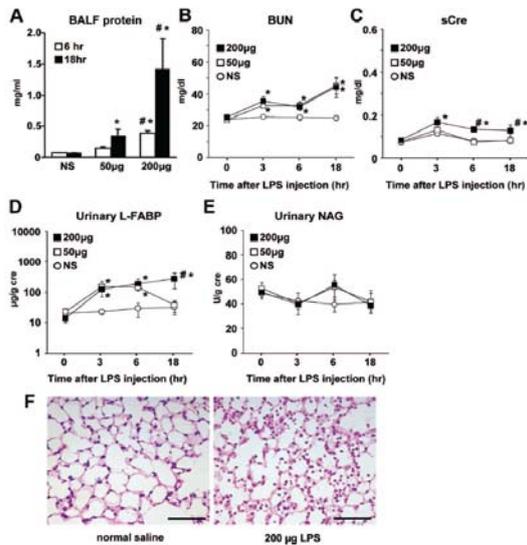
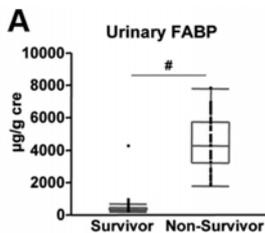


図2 LPS気道内投与モデルにおける検討  
(A) 肺胞洗浄液中タンパク濃度 (B) BUN  
(C) 血清クレアチニン (D) 尿中 L-FABP  
(E) 尿中 NAG (F) 肺病理組織

同時にヒト臨床における敗血症性急性腎不全症例における尿中 L-FABP を測定した。145 名の敗血症性急性腎不全症例のうち、68 名が死亡退院となり、死亡群における尿中 L-FABP は生存群と比較して有意に上昇していたことを明らかにした (下図)。



本研究で得られた知見をさらに広げるべく、東京大学医学部附属病院混合型 ICU において成人 ICU339 症例における尿 L-FABP 測定を行い、ヒト臨床における尿 L-FABP の新規バイオマーカーとしての性能評価を行い、論文発表を行った (Evaluation of new acute kidney injury biomarkers in a mixed intensive care unit. Doi K, et al. Crit Care Med. 2011 ;39:2464-9.)。本論文は国際的に高く評価され、2011 年アイルランドで行われた ADQI バイオマーカーミーティングにおいて取り上げられた。また、尿中 L-FABP 測定が対外診断薬としての承認を受ける際にも、研究代表者が行った一連の研究が参考資料として用いられた。

## 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 4 件)

①Mild elevation of urinary biomarkers in pre-renal acute kidney injury. Doi K, Katagiri D, Negishi K, Hasegawa S, Hamasaki Y, Fujita T, Matsubara T, Ishii T, Yahagi N, Sugaya T, Noiri E. Kidney Int (in press) 査読有

②Evaluation of new acute kidney injury biomarkers in a mixed intensive care unit. Doi K, Negishi K, Ishizu T, Katagiri D, Fujita T, Matsubara T, Yahagi N, Sugaya T, Noiri E. Crit Care Med. 2011; 39:2464-9. 査読有

③ Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. Doi K, Noiri E, Sugaya T. Curr Opin Crit Care 2010; 16: 545-549. 査読有

④ Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury. Doi K, Noiri E, Maeda-Mamiya R, Ishii T, Negishi K, Hamasaki Y, Fujita T, Yahagi N, Koide H, Sugaya T, Nakamura T. Crit Care Med. 2010; 38: 2037-42. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①Doi K, et al. Comparison of urinary L-FABP with NGAL and IL-18 in an adult heterogeneous ICU population. 米国腎臓学会年次総会 2010 年 11 月 18 日 米国 (デンバー)

②土井, 他. ICU急性腎障害における尿中L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)測定の意義. 第107回日本内科学会講演会 2010年4月9日 東京

③Doi K, et al. Evaluation of urinary L-FABP as an AKI biomarker in mixed ICU. 米国腎臓学会年次総会 2009 年 10 月 30 日 米国 (サンディエゴ)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 敗血症又は多臓器不全の予後診断方法及び予後診断用キット

発明者: 菅谷健、野入英世、土井研人

権利者: 国立大学法人東京大学

番号：PCT/JP2010/061957  
出願年月日：2010年7月15日  
国内外の別：国際出願

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土井 研人 (DOI KENT)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80505892

### (2) 連携研究者

野入 英世 (NOIRI EISEI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：00301820

矢作 直樹 (YAHAGI NAOKI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：60158045