

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460877

研究課題名(和文)慢性肝疾患モデルマウスにおける感染起因性腎障害の病理病態学的検討

研究課題名(英文) Infection-induced renal impairment in a chronic liver disease mouse model

研究代表者

小谷 泰一 (Kotani, Hirokazu)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20330582

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)：薬剤によって誘発される慢性肝障害モデルマウスを用いて、慢性肝疾患患者の腎臓に生じる病理病態学的変化を解明する研究を行った。その結果、このモデルは薬剤や感染によって誘発される腎臓障害の悪化をオートファジーなどにより抑制することがわかった。このことより、このモデルは腎臓が薬毒に対する耐性を獲得する機序の解明、さらに感染併発時に悪化する腎障害の進行を抑制する治療法の開発に有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed a pathophysiological study of renal injuries in a model mouse of chronic liver disease induced by a drug. The kidney of this model showed acute kidney injury with sublethal tubular cell injury and developed resistance for drug- or infection-induced renal impairment by physiological mechanisms including autophagy. This chronic liver disease model showing acute kidney injury with sublethal injury is a potentially useful tool for the study of pathophysiological mechanisms to develop resistance for renal impairment in patients with chronic liver disease, and could lead to the development of novel therapeutic and protective strategies to improve the prognosis of patients with infectious complications.

研究分野：法医病理

キーワード：慢性肝障害 腎障害 ミトコンドリア障害 オートファジー 酸化ストレス sublethal cell injury

1. 研究開始当初の背景

法医学者が行う死因究明は言わば「最後の医療」である。病死(内因死)も法医解剖の対象であり、対象症例に占める割合は意外に大きい。さらに、診療関連死の死因究明は社会的な重要課題の一つとされ、病死に関する高いレベルの解析を法医学者は国民から期待されている。従って、院内死亡が多いことから法医解剖される機会があまりなかった肝硬変等の慢性疾患の死因に関する研究も法医学的観点から進める必要がある。

肝硬変等の慢性肝疾患に腎不全を合併すると予後は極端に悪化し、その契機としては感染症の合併が約50%と最多で、3か月生存率は約30%と肝腎症候群に次ぐ低さである(文献①)。従って、法医解剖による肝硬変患者の死因診断では、感染症や腎障害の有無を精査する必要がある。そして、その腎障害が感染症によって惹起されたかを正確に判断するためには、慢性肝疾患に感染を合併した時に腎臓に生じる病理学的変化の知見を集積しなければならない。しかしながら、これまでは多数の肝硬変患者を臨床的に解析した疫学研究が主体で、法医解剖での死因究明を念頭においた病理学的研究は殆ど行われてこなかった(文献②)。また、モデル動物を用いた研究は、主に移植や虚血再灌流モデル等の急性肝障害に合併した腎障害の検討であり、慢性肝障害のモデル動物を用いた研究は進んでいないのが現状である。

申請者らの研究室では、これまで3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dehydrocollidine(以下、DDC)という薬剤を食餌性に投与することで肝硬変へと進行する硬化性胆管炎モデルマウスを用いた研究を行ってきた(文献③)。

そこで、この硬化性胆管炎モデルマウスに感染症を合併させ、その時の腎臓に生じる病理病態学的変化を解析すれば、慢性肝疾患患者における死因診断の精度を向上させることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では感染合併慢性肝障害マウスの腎臓病理組織学的変化と腎機能障害の経時的変化を明らかにすることで、肝硬変死亡例の死因診断に応用できる感染起因性腎障害の病理学的診断基準の構築を目指す。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) 腎臓の病理形態学的変化の特定とその経時的推移の把握

硬化性胆管炎マウスに内毒素(以下、LPS)を投与した一定時間後に腎臓を摘出し組織標本を作製する。そして、特殊染色や免疫染色を含めた光学顕微鏡検査及び電子顕微鏡検査を行うことで腎糸球体や腎尿細管の病理組織所見を特定し、その経時的変化を明らかにする。

(2) 各種腎機能障害マーカーの測定と評価

上記(1)と同時期に血液および尿を採取する。そして、腎機能、電解質、血液ガスなど各種の検査データを経時的に解析することで腎機能障害の種類と経時的変化を明らかにする。

(3) 慢性肝疾患における感染起因性腎障害の病理学的診断基準の構築

上記(1)と(2)で得られた知見を総合的に纏める。各時点の所見を対照群と比較することでスコア化し、慢性肝疾患に合併した感染で誘導された腎障害の病理学的診断基準を構築する。

3. 研究の方法

慢性肝疾患の1つである硬化性胆管炎を誘発することが知られている3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)をBALB/cマウスに食餌性(0.1%)に投与する。対照群はDDCを含まない餌で飼育する。

(1) 肝障害早期における腎障害の検討

DDC投与後1日、3日、7日目に肝及び腎の免疫組織化学的・超微細構造学的検査を含む病理学的検査、さらに臓器障害マーカーや酸化ストレス・オートファジー関連物質などを血清学的・遺伝子学的検査やWestern blotで検討する。

(2) 肝障害進展期の検討

DDC投与後14日、56日目に(1)と同様の方法で肝及び腎の病理学的・血清学的検査を行う。

(3) 肝・腎障害の相互関係の検討

高濃度DDC(0.5%)投与実験と、3日間のDDC投与後に7日間及び28日間通常の餌に戻す回復実験を行い、両臓器の反応性を比較する。

(4) 感染併発時の検討

DDC投与後14日目のマウスに、4段階の濃度設定をしたLPSを腹腔内投与し、腎臓及び腎機能検査結果を通常餌を与えた対照群のマウスと比較し、DDC依存性に腎機能が悪化するかを検討する。そして、悪化が確認されれば感染起因性腎障害の病理組織学的診断基準を構築する。

4. 研究成果

(1) 肝障害早期における腎障害の検討

肝障害早期の検討では、DDC投与後1日目から腎機能障害を示し、血中クレアチニン値が約1.7倍、尿中neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)値が約10倍に上昇したが、光学顕微鏡による通常の検査では7日間を通じて腎臓に細胞死や炎症細胞浸潤を含む明らかな形態変化は認めなかった。一方、電子顕微鏡検査で近位尿細管上皮細胞に刷子縁微絨毛の消失・ミトコンドリア傷害を認め(図1、図2)、免疫組織化学検査で

尿細管傷害マーカーである kidney injury molecule-1 陽性を示す尿細管上皮細胞や酸化ストレス関連物質 (4-hydroxy-2-nonenal・3-nitrotyrosine) の増加がみられた。

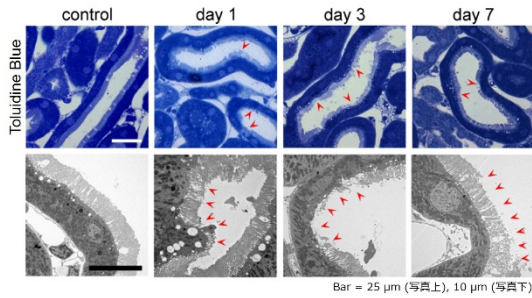


図1 近位尿細管における刷子縁消失

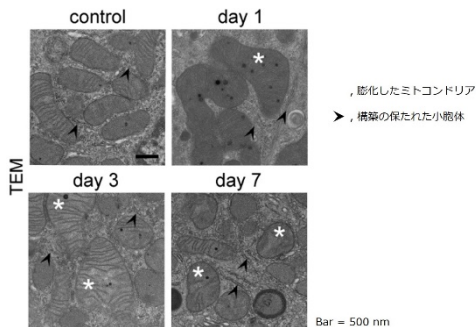


図2 近位尿細管のミトコンドリア傷害

これらの軽微な腎障害所見は sublethal tubular cell injury として知られる病態と一致していた。

また尿細管上皮には、再生性変化として投与後 1 日、3 日目に細胞分裂像と Ki-67 陽性細胞の増加を、細胞死への進行抑制機構として single-cell extrusion やオートファゴソーム及びオートファジー関連タンパク質 (microtubule light-chain protein 3-phosphatidylethanolamine conjugate・p62) の増加を認めた。

さらに各種遺伝子発現の検討では interleukin-6 と tissue inhibitor of metalloproteinase 1 が軽度上昇していた。

(2) 肝障害進展期の検討

肝障害進展期では、腎機能障害は悪化を伴わず持続し、間質の線維化が出現した(図3)。

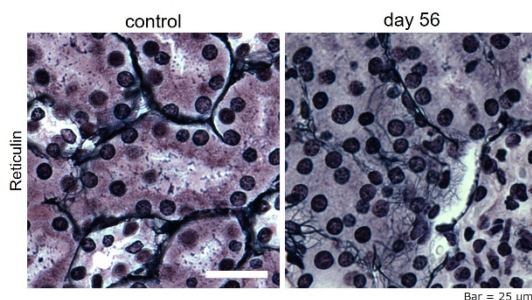


図3 進展期の腎臓間質線維化

(3) 肝・腎障害の相互関係の検討

肝障害は DDC の濃度依存性に悪化し通常の

餌で対照群レベルまで回復したが、腎障害への影響は肝障害に比し高濃度 DDC 投与実験・回復実験ともに小さかった。

(4) 感染併発時の検討

肝臓は DDC 投与群が対照群より有意に障害されたが、実験当初の仮説と異なり、LPS 投与群の腎組織障害、腎機能障害は対照群に比較して軽度で、腎臓では DDC 投与群の方がむしろ感染併発による機能の悪化が抑制された。このモデルのオートファジー活性化による腎機能悪化抑制機序を総合すると、この肝障害モデルでは、オートファジーが活性化することで薬毒物に対する耐性が獲得され、感染症合併時でも腎機能の悪化を抑制することが示唆された。

(5) 研究成果のまとめと展望

慢性肝疾患モデルマウスの早期には、腎障害として sublethal tubular cell injury が出現することが明らかになった。また、ミトコンドリア傷害・酸化ストレスが腎障害の病態に関連していること、そして、むしろ尿細管上皮細胞は single-cell extrusion やオートファジーの活性化により細胞死に進行せぬよう保護されていることが示された。そして、肝障害進展期に至り、この腎障害が長期化すれば腎間質に線維化が出現することが明らかとなった。これらの結果は、査読ありの英語論文として報告した。

また、このオートファジーなどによって保護された腎臓を有する DDC 投与慢性肝障害マウスに LPS 投与で感染を併発させると、LPS 投与群の腎機能及び組織障害は対照群に比較してむしろ軽度で、腎臓では DDC 投与群の方が機能の悪化が抑制された。この結果、DDC 投与により慢性肝障害に至っているマウスの腎臓は、むしろ感染に対して抵抗性を有していることが示された。

この研究により明らかとなった DDC 投与マウスの腎臓に認められる Sublethal tubular cell injury は、急性腎不全の基準を満たすものの光学顕微鏡では形態学的異常が認められない障害で、ヒトの急性腎不全でもしばしば遭遇することが知られている。本モデルの腎障害機序をさらに検討すれば、慢性肝疾患患者に合併した腎障害の病態解明に貢献すると考えられる。

また、DDC 投与マウスが感染併発による腎機能障害に対してむしろ抵抗性を示すことは、研究当初の仮説に反する予想外の結果で、当初の目的である感染起因性腎障害の病理組織学的診断基準を構築することはできなかった。しかしながら、このモデルのオートファジー活性化による腎機能悪化抑制機序を総合すると、この肝障害モデルでは、オートファジーが活性化することで薬毒物に対する耐性が獲得され、感染症合併時でも腎機能の悪化を抑制することが示唆されており、ヒトや動物の感染抵抗性獲得機序の解明研究に応用可能と

考えられた。

以上、本研究により、DDC 投与慢性肝障害モデルマウスは、single-cell extrusion やオートファジーによる薬毒物耐性獲得機序の解明、さらには肝障害に併発する感染によって生じる腎機能障害の悪化を抑制する治療法の開発に有用であることが明らかとなった。

<引用文献>

① Martin-Llahi M et al. Prognostic importance of the cause of renal failure in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 140: 2011;488 - 496.

② Tsien CD et al. Acute kidney injury in decompensated cirrhosis. *Gut* 62(1): 2013; 131-137.

③ Masashi M et al. Bile canalicular abnormalities in the early phase of a mouse model of sclerosing cholangitis. *Digestive and Liver Disease* 45: 2013; 216-225.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Tokiko Ishida, Hirokazu Kotani, Masashi Miyao, Chihiro Kawai, Leila Jemal, Hitoshi Abiru, and Keiji Tamaki. Renal Impairment with Sublethal Tubular Cell Injury in a Chronic Liver Disease Mouse Model. *PLoS One*. 査読あり. 11(1): 2016; e0146871.
DOI: 10.1371/journal.pone.0146871
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/>

② Masashi Miyao, Hirokazu Kotani, Tokiko Ishida, Chihiro Kawai, Sho Manabe, Hitoshi Abiru, and Keiji Tamaki. Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression. *Laboratory Investigation* 査読あり. 95(10): 2015; 1130-1144.
DOI: 10.1038/labinvest.2015.95
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/>

③ Masashi Miyao, Munetaka Ozeki, Hitoshi Abiru, Sho Manabe, Hirokazu Kotani, Tatsuaki Tsuruyama, and Keiji Tamaki. Bile canalicular abnormalities in the early phase of a mouse model of sclerosing cholangitis. *Digestive and Liver Disease* 査読あり. 45: 2013; 216-225.
DOI: 10.1016/j.dld.2012.09.007
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/>

[学会発表] (計3件)

① 宮尾昌、ジェマイルレイラ、南博蔵、阿比留仁、小谷泰一、玉木敬二 交感神経遮断薬は慢性期 NASH モデルマウスの病態進展を抑制しない 第 63 回日本法医学会学術集会近畿地方集会. 東京 2016

② 石田季子、宮尾昌、川合千裕、ジェマイルレイラ、小谷泰一、玉木敬二 新規 AKI モデルマウスにおける sublethal cell injury の発生機序 第 99 次日本法医学会学術全国集会. 高知 2015

③ 石田季子、川合千裕、阿比留仁、宮尾昌、小谷泰一、玉木敬二 Development of a novel mouse model demonstrating human acute kidney injury 第 98 次日本法医学会学術全国集会. 福岡 2014

[図書] (計1件)

① 川合千裕、小谷泰一、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2017、93-98

[その他]

ホームページ等

<http://www.fp.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 泰一 (KOTANI, Hirokazu)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20330582

(2) 研究協力者

玉木 敬二 (TAMAKI, Keiji)
宮尾 昌 (MIYAO, Masashi)
石田 季子 (ISHIDA, Tokiko)