

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 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：26461224

研究課題名(和文)腎障害およびエネルギー代謝におけるNgalの役割

研究課題名(英文)A Role of NGAL in Renal Injury and Energy Metabolism

研究代表者

今牧 博貴 (Imamaki, Hirotaka)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30724223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性維持血液透析患者において血清NGAL値は健常人の13倍に増加し、末梢血好中球数、筋肉量、蛋白摂取量により規定された。血清NGAL低値の透析患者では1年間で有意に血清アルブミン値が低下し、入院を要する重症感染症を発症しやすい傾向を示した。薬剤誘導性メガリンノックアウトマウスを用いて、尿蛋白再吸収をほぼ完全に遮断すると、細胞死を伴わなくとも、尿中NGAL値が800倍に著増した。高脂肪食負荷あるいは寒冷暴露を行うと、NGALノックアウトマウスではコントロールマウスと比して、褐色脂肪がより強く活性化され、体重増加および体温低下が抑制された。NGALは肥満時に白色脂肪で発現誘導され、肥満を増強した。

研究成果の概要(英文)：Among maintenance hemodialysis patients, serum NGAL levels were elevated by 13-fold compared to healthy subjects. In hemodialysis patients with low serum NGAL levels, serum albumin levels were significantly reduced after a year, and such patients showed a tendency to develop severe infection requiring admission. In drug-inducible megalin knockout mice, renal protein reabsorption was completely inhibited in the absence of tubular cell death, and urinary NGAL excretion was increased by 800-fold. In NGAL knockout mice, brown adipose tissue was more intensely activated by high fat diet treatment or by cold exposure compared to control mice, and body weight gain or body temperature loss was inhibited. NGAL was a novel circulating factor induced in white adipose tissues by obesity, which plays a positive feedback role to enhance obesity.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：バイオマーカー 腎障害 栄養 肥満 血液透析 感染症 メガリン 褐色脂肪

1. 研究開始当初の背景

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)は腎分化誘導作用、腎保護作用などを有すると共に、急性腎障害および慢性腎臓病では血液中と尿中の NGAL が著しく増加するため、NGAL は腎障害の新規バイオマーカーとして注目を浴びている。

NGAL は腎障害において最も強く発現誘導を受ける分子であるが、例えば開心術後の尿中 NGAL は術後数時間のうちに増加と減少を示すことから、尿中 NGAL の調節には腎臓での産生量の変化以外の要素が関与していることが強く推測される。本研究ではとくに近位尿細管での NGAL の再吸収が尿中 NGAL 濃度に及ぼす影響を厳密に評価した。

また本研究では、腎障害以外に血中 NGAL 濃度を規定する因子が何であるかを明らかにするために血液透析患者の血中 NGAL 濃度の規定因子を多変量解析により検討した。血液透析患者は比較的均一な患者集団であり、定期的な血液検査を受けているために蛋白摂取量や筋肉量を推測しやすいという利点を持っている。

さらに肥満により血中 NGAL 濃度が増加するという報告があるが、エネルギー代謝における NGAL の役割には未解明の部分が多いので NGAL 欠損マウスの表現型を解析した。

2. 研究の目的

腎障害以外に血中 NGAL 濃度を規定する因子が何であるかを明らかにすること。

近位尿細管での NGAL の再吸収が尿中 NGAL 濃度に及ぼす影響を明らかにすること。

エネルギー代謝における NGAL の役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

慢性維持血液透析患者の血清 NGAL 濃度を ELISA 法にて測定した。栄養、感染を含めた種々の臨床指標との相関を横断的、縦断的に解析した。

Cre-loxP 系および tamoxifen を用いて、薬剤誘導性、近位尿細管特異的にメガリン遺伝子を破壊し、アルブミンや NGAL などの蛋白の再吸収を阻害した。このマウスの尿中の各蛋白の排泄量は、糸球体ろ過量を忠実に反映すると考えられた。

NGAL 欠損マウスと野生型マウスに対して高脂肪食あるいは寒冷暴露の負荷をかけ、エネルギー代謝にかかわる表現型を解析した。寒冷暴露には予め 4 に冷却した小型ケージにマウスを一匹ずつ入れて、1 時間ごと

に 4 時間まで直腸温を測定した。Siderophore としては大腸菌由来の enterochelin (EMC Microcollections)を使用した。3 アドレナリン受容体拮抗薬として SR59230A (5mg/kg)を 3 日間投与した。

4. 研究成果

慢性維持血液透析患者の横断的解析において血清 NGAL 値は末梢血好中球数、筋肉量 (%クレアチニン産生速度)、蛋白摂取量(アミノギャップ)の 3 者により独立に規定されていた [末尾発表論文 1]。新しい栄養指標として 1 年間の血清アルブミン値の変化量 (Alb)に着目し、Alb を予測する因子を縦断的に解析すると、ベースラインの NGAL 値および好中球数と正相関、アルブミンとは負相関を示した。NGAL 値はアルブミン値と共に血液透析患者の栄養指標として有用であることが上記の横断的解析から明らかになったが、透析患者の低栄養の主要な原因である感染・炎症によって NGAL は増加する一方でアルブミンは低下するため、Alb を予測するベースラインの指標としては NGAL が最も強力であった。言い換えると、感染に伴う低アルブミン血症は抗生剤による治療により改善することが期待されるが、低 NGAL 血症には感染が合併している可能性は低く病態の改善を望めないことが多いと解釈された。また NGAL 低値の透析患者は入院を必要とする重症感染症を発症する頻度が高い傾向にあった。

以上より、血中および尿中 NGAL は急性腎障害および慢性腎臓病の重症度の指標と考えられているが、透析患者の栄養指標となることが明らかとなった [1]。これは血清クレアチニンや尿素窒素と酷似しており、腎障害時に血中で増加するバイオマーカーの宿命と言える。

尿中 NGAL は腎糸球体、近位尿細管、遠位ネフロンの中のいずれの異常によっても増加することをすでに報告した。今回、薬剤誘導性遺伝子改変マウスを用いて、adult の時期に近位尿細管のメガリン遺伝子を破壊し、蛋白再吸収をほぼ完全に遮断すると、尿中アルブミン排泄は 16 倍、NGAL 排泄は 800 倍にまで増加した [2]。この変異マウスの腎臓にはアポトーシスやネクローシスは観察されなかったが、近位尿細管において再吸収装置であるエンドソームやリサイクリング小胞の著減を認めた。

以上より、尿中 NGAL は尿細管障害の指標と短絡的に理解されているが、近位尿細管の機能不全は細胞死を伴わなくとも尿中 NGAL 値の著しい上昇をもたらすことが明らかとなった [2]。

上述のように血清 NGAL 値は腎障害、感染のみならず過栄養・肥満でも増加する。高脂

肪食負荷時には、NGAL は白色脂肪で発現誘導されたが、褐色脂肪での発現量は少なかった [3]。また高脂肪食負荷時に NGAL 欠損マウスは野生型マウスに比べ摂餌量が多いが、体重増加は抑制され白色脂肪重量も軽かった。また野生型では高脂肪食負荷により耐糖能及びインスリン感受性の悪化が見られたが、NGAL 欠損マウスではこれらは有意に抑制されていた。さらに高脂肪食負荷後に NGAL 欠損マウスの酸素消費量は野生型よりも高値であった。

次に、通常食で飼育後に NGAL 欠損マウスに寒冷暴露を与えると野生型よりも体温が低下しにくかった。また寒冷暴露後に NGAL 欠損マウスでは褐色脂肪において、熱産生を規定する Ucp1、Ppargc1a、Dio2 遺伝子の発現亢進と (ブドウ糖類似物質である) 18F-fluorodeoxyglucose (FDG) の取り込み亢進を認め、褐色脂肪の活性化が促進されていた。さらに (NGAL 蛋白単体ではなく) NGAL:siderophore:鉄複合体または 3 アドレナリン受容体拮抗薬を腹腔内投与する、あるいは肝臓で NGAL 遺伝子を過剰発現させると、NGAL 欠損マウスの寒冷耐性は消失したことから、NGAL は鉄依存的に、交感神経 3 経路を介した熱産生を抑制する働きがあると考えられた。

以上より、NGAL は肥満に伴い白色脂肪で発現誘導され、脂肪蓄積に対して positive feedback loop を形成する分泌蛋白の一つであると考えられた [3]。

このほかにも他施設との共同研究により、NGAL の多彩で全身におよぶ病態生理的意義を報告した。京都大学呼吸器内科の半田知宏先生らとの共同研究により、特発性肺線維症患者の肺生検組織では蜂巣状嚢胞性病変における気管支化変性肺胞上皮に NGAL 蛋白が高度に発現しており、局在は組織障害性プロテアーゼである MMP9 とよく一致した [4]。同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、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。

コロンビア大学腎臓内科の Jonathan Barasch 教授との共同研究により、急性腎盂腎炎のモデルにおいて、膀胱内の大腸菌は逆行性に腎臓内に侵入、介在細胞表面に付着し toll-like receptor 4 の活性化を介して、尿を酸性化すると共に尿中に NGAL を分泌して大腸菌の増殖を抑制することを示した [5]。

京都大学血液腫瘍内科の高折晃史教授らと共に、白血病治療のために同種骨髄幹細胞移植を受けた症例の血液、尿中 NGAL の推移を検討し、健常時や細菌感染時には血液中 NGAL の 70%以上が好中球由来であるのに対して、急性腎障害では腎臓由来の NGAL が血中で増加すると考えられた [6]。

札幌医科大学消化器内科の仲瀬裕志教授

らとの研究により、炎症性腸疾患のモデルにおいて、NGAL 欠損マウスではマクロファージ内での大腸菌の貪食・除去が減弱するために炎症性腸疾患が重症化することを明らかにした [7]。

以上のように、NGAL は全身の各臓器で様々な作用を発揮していることが続々と示されている。なかでも NGAL は感染防御での自然免疫において特に重要な役割を果たしていると考えられる。

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9件)

- (1) Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Kuwahara T, Satoh M, Nakatani K, Saito Y, Tomosugi N, Sugawara A, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Mori K. Low Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Level as a Marker of Malnutrition in Maintenance Hemodialysis Patients. *PLoS One* 10:e0132539, 2015. [doi: 10.1371/journal.pone.0132539]
- (2) Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28:278-289, 2017. [doi: 10.1681/ASN.2015101168]
- (3) Ishii A, Katsuura G, Imamaki H, Kimura H, Mori KP, Kuwabara T, Kasahara M, Yokoi H, Ohinata K, Kawanishi T, Tsuchida J, Nakamoto Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Obesity-promoting and anti-thermogenic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in mice. *Submitted*.
- (4) 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]

- (5) Paragas N, Kulkarni R, Werth M, Schmidt-Ott KM, Forster C, Deng R, Zhang Q, Singer E, Klose AD, Shen TH, Francis KP, Ray S, Vijayakumar S, Seward S, Bovino ME, Xu K, Takabe Y, Amaral FE, Mohan S, Wax R, Corbin K, Sanna-Cherchi S, Mori K, Johnson L, Nickolas T, D'Agati V, Lin CS, Qiu A, Al-Awqati Q, Ratner AJ, Barasch J. alpha-Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection. *J Clin Invest* 124:2963-2976, 2014. [doi: 10.1172/JCI71630]
- (6) 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* 19:99-106, 2015. [doi: 10.1007/s10157-014-0952-7]
- (7) Toyonaga T, Matsuura M, Mori K, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Kobayashi T, Hibi T, Nakase H. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Sci Rep* 6:35014, 2016. [doi: 10.1038/srep35014]
- (8) Ujike-Omori H, Maeshima Y, Kinomura M, Tanabe K, Mori K, Watatani H, Hinamoto N, Sugiyama H, Sakai Y, Morimatsu H, Makino H. The urinary levels of prostanoid metabolites predict acute kidney injury in heterogeneous adult Japanese ICU patients: a prospective observational study. *Clin Exp Nephrol* 19:1024-1036, 2015. [doi: 10.1007/s10157-015-1092-4]
- (9) Sugimoto K, Toda Y, Iwasaki T, Shimizu K, Kanazawa T, Muto N, Kawase H, Morimatsu H, Morita K, Maeshima Y, Mori K, Sano S. Urinary Albumin Levels Predict Development of Acute Kidney Injury After

Pediatric Cardiac Surgery: A Prospective Observational Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 30:64-68, 2016. [doi:10.1053/j.jvca.2015.05.194]

[学会発表](計18件)

- 1) 石井輝, 今牧博貴, 森潔, 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. 分泌シグナル Ngal による肥満の positive feedback. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014 年 4 月 26 日. 福岡
- 2) 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 日. 大阪
- 3) 今牧博貴, 森潔, 森慶太, 石井輝, 栗原孝成, 笠原正登, 横井秀基, 古賀健一, 加藤有希子, 戸田尚宏, 大野祥子, 中尾一和, 菅原照, 柳田素子, 向山政志. 健常人及び腎不全症例における血中・尿中 NGAL の分子量の違い. 第 57 回日本腎臓学会学術総会. 2014 年 7 月 4 日. 横浜
- 4) Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Low Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Level as a Malnutrition Marker in Hemodialysis Patients. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Nov. 13, 2014. Pennsylvania, USA
- 5) 森潔, 横井秀基, 笠原正登, 柳田素子. AKI バイオマーカーとしての尿中 NGAL の特徴と集中治療・循環器領域への応用. 第 42 回日本集中治療医学会学術集会 (招聘講演). 2015 年 2 月 10 日. 東京
- 6) 森慶太, 横井秀基, 笠原正登, 栗原孝成, 今牧博貴, 中尾一和, 遠藤知美, 柳田素子, 向山政志, 森潔. 糖尿病性腎症の微量アルブミン尿期に糸球体濾過されるアルブミンの増加は微量では

- ない. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015 年 5 月 21 日. 下関
- 7) 森潔. 糖尿病症例で尿中微量アルブミンを測らない 4 つの理由. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 (招聘講演). 2015 年 5 月 23 日. 下関
- 8) 森潔, 今牧博貴, 石井輝, 森慶太, 横井秀基, 柳田素子. 尿中 AKI バイオマーカー. 第 58 回日本腎臓学会 (招聘講演). 2015 年 6 月 5 日. 名古屋
- 9) 森慶太, 横井秀基, 笠原正登, 栗原孝成, 今牧博貴, 中尾一和, 遠藤知美, 柳田素子, 向山政志, 森潔. 薬剤誘導性遺伝子改変システムを用いた糖尿病性腎症におけるアルブミンの糸球体濾過量の評価. 第 58 回日本腎臓学会. 2015 年 6 月 7 日. 名古屋
- 10) 森潔, 今牧博貴, 石井輝, 森慶太, 横井秀基, 笠原正登, 栗原孝成, 桑原隆, 佐藤真杉, 菅原照, 向山政志, 柳田素子. 慢性維持血液透析患者において現在および将来の血清アルブミン濃度を予測する指標. 第 60 回日本透析医学会学術集会. 2015 年 6 月 27 日. 横浜
- 11) Mori KP, Yokoi H, Kasahara, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Novel drug-inducible megalin knockout mice reveal marked increase of both total nephron glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in early diabetic nephropathy. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Nov. 5, 2015. San Diego, USA
- 12) Ikegaya N, Mori K, Yamamura Y, Tomida M, Takehara S, Yoshida T, Kumagai H, Seki G. Subarachnoid Hemorrhage induces Transient Renal Dysfunction. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Nov. 5, 2015. San Diego, USA
- 13) Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Prediction of Changes in Serum Albumin Levels among Hemodialysis Patients by Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Levels. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Nov. 6, 2015. San Diego, USA
- 14) 石井輝, 今牧博貴, 勝浦五郎, 木村寛之, 森慶太, 栗原孝成, 横井秀基, 笠原正登, 中尾一和, 柳田素子, 向山政志, 森潔. エネルギー代謝における鉄輸送蛋白 NGAL の意義. 第 53 回日本臨床分子医学会総会学術集会. 2016 年 4 月 15 日. 東京
- 15) 石井輝, 今牧博貴, 勝浦五郎, 木村寛之, 中本裕士, 森慶太, 栗原孝成, 横井秀基, 笠原正登, 中尾一和, 柳田素子, 向山政志, 森潔. 褐色脂肪での熱産生・FDG 取り込みに対する鉄輸送蛋白 NGAL の抑制効果とメカニズム. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016 年 5 月 20 日. 京都
- 16) 森慶太, 横井秀基, 笠原正登, 栗原孝成, 今牧博貴, 石井輝, 中尾一和, 柳田素子, 向山政志, 森潔. 異なる分子量の蛋白に関する正常糸球体での透過性の違いと早期糖尿病性腎症における変化の検討. 第 59 回日本腎臓学会学術総会. 平成 28 年 6 月 17 日. 横浜
- 17) Mori KP, Yokoi H, Kasahara, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Microalbuminuric stage of diabetic nephropathy is characterized with enhancement of total nephron albumin filtration and reabsorption. Asian Pacific Congress of Nephrology. Sep. 18, 2016. Perth, Australia
- 18) Tanaka S, Yamada R, Matsuo K, Matsuo Y, Murakami M, Sonoda A, Mori K, Mori N. Factors Predicting Renal Events among Chronic Kidney Disease Patients including Post-Kidney Transplantation Cases. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Nov. 19, 2016. Chicago, USA
- 〔その他〕
ホームページ
- 1) 京都大学大学院医学研究科腎臓内科学・研究領域
<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/yokoi.html>
- 2) 静岡県立大学教員データベース

<http://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/prof656.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今牧博貴 (IMAMAKI HIROTAKA)
京都大学大学院医学研究科腎臓内科学
・ 客員研究員
研究者番号： 3 0 7 2 4 2 2 3

(2) 研究分担者

森 潔 (MORI KIYOSHI)
静岡県立大学薬学部分子臨床薬理学
・ 特任教授
研究者番号： 6 0 3 4 3 2 3 2