

145. 致死性腎障害の発症機序および全身病態への関与の解明

中野 大介

香川大学 医学部 薬理学講座

Key words : 急性腎障害, 乏尿, 近位尿細管 TLR4

緒言

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は、急激な腎機能の低下により、尿生成不全および糸球体濾過能の減少が起きる状態を指す。AKI の発症率はこの 10 年間、上昇の一途を辿り、致死率も高く留まっている¹⁾。この AKI に対して、未だ臨床において抗 AKI 薬として優位性を示したものはない²⁾。これは更なる研究に基づく、新たなアプローチの必要性を示唆するものである。

AKI、特に ICU 内における AKI の発症原因として、敗血症は大きな割合を占めている。われわれは、その病態理解ひいては治療診断法開発を目指して、リアルタイム生体イメージングによる解析を行っている^{3,4)}。まずわれわれは、腎臓の根源的な生理機能であり、AKI 時に破綻するものとして、尿生成機能に着目した。2 光子顕微鏡を用いた、生きた動物を用いる実験系であれば、正常尿生成と、AKI 時の尿生成を比較し、AKI (尿生成不全 + 糸球体濾過減少) 病態の本態に迫れると考えた。

方法および結果

敗血症モデルとして lipopolysaccharide (LPS) および盲腸結紮穿刺モデル (CLP) を採用した。LPS (*E.Coli* O55, 5 mg/kg) をマウスに腹腔内投与あるいは盲腸を吻合し 22G 針にて 2 か所穿孔し、内容物による感染を引き起こし敗血症を誘導した。代謝ケージにて 24 時間の尿量を測定、24 時間後の血中尿素窒素 (BUN) を測定した。尿量は有意に減少し、同時に BUN の上昇が確認でき、AKI の発症が確認できた。本研究に用いた用量では、LPS は投与 8 時間後までの血圧 (テレメトリー法により測定) に有意な影響を与えなかった。このモデルに対して、50 mL/kg の生理食塩水を LPS 投与 4 および 18 時間後に皮下投与することによる間歇的輸液蘇生⁵⁾を行った場合、24 時間尿および BUN ともに正常化がみられた。

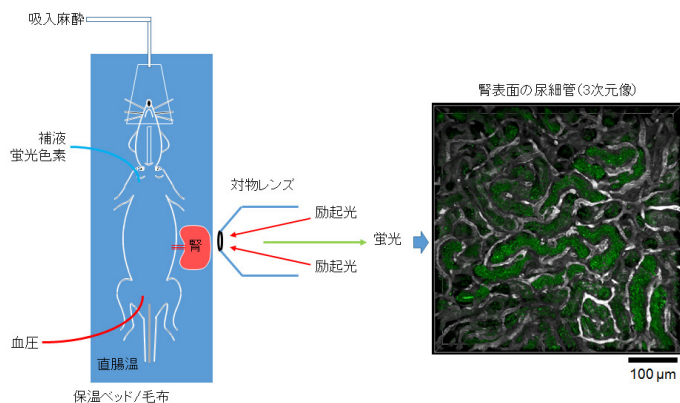


図 1. 2 光子レーザー顕微鏡によるマウス腎観察条件の模式図

線状につながったものが毛細血管、毛細血管内の影が血球成分となる。毛細血管に囲まれた管が尿細管。

続いて、イソフルラン麻酔下マウスの腎臓を露出し、2光子レーザー顕微鏡により腎ライブイメージングを行った³⁾。図1に示す実験条件にて、静脈内に rhodamine B 標識 70 kD dextran を投与し、毛細血管を描出した。2光子レーザー顕微鏡を用いた血液の描出法では血球成分は血漿内 (rhodamin B-70 kD dextran) を流れる影として描出される。敗血症マウスでは、DIC (播種性血管内凝固症候群) による毛細血管内凝固塊や白血球の接着がみられ、赤血球の循環不全が確認された (図2)。敗血症腎では、全腎灌流量の低下が起きる前の段階から機能不全が生じることが知られており⁶⁾、近年の研究により、局所的な虚血が生じる微小循環障害が問題であることが提起されている。今回の実験により、「血漿成分は残されたまま、血球成分の輸送が阻害される」微小循環不全が初めて確認された。さらに、この血球成分が遮断された毛細血管に接する尿細管では、ミトコンドリア活性 (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, *i.v.* bolus) が著しく低下していることもわかった。驚いたことに、これらの微小循環障害は間歇的輸液蘇生では改善されなかった。

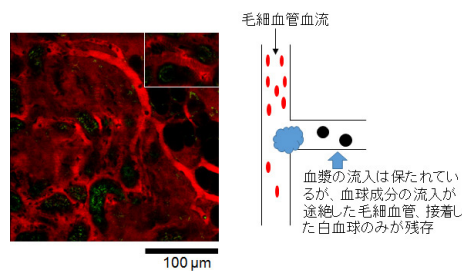


図2. LPS 投与後 6 時間後の腎毛細血管像

左図：正常血管 (左図右上の挿入図) では高速で流れる赤血球が斜線として描出されるが、敗血症腎では赤血球の流れが障害され、多数の白血球接着が確認できた。右図は、模式図。

続いて、腎機能の異常を、さらに詳しく検討した。一般に、腎機能は血漿クレアチニン濃度で評価されることが多いが、実験的にはイヌリンによる評価が最も信頼性のある腎機能評価である。われわれは、静脈内に蛍光標識イヌリンあるいは類似物質を bolus 投与し、体内あるいは腎イメージング領域内から消失する速度により、腎機能を測定した。本モデルにおいて、LPS 投与 6 時間後においては全腎糸球体濾過量に変化はみられなかった。2光子顕微鏡の観察領域において、静脈内投与した蛍光標識イヌリンが尿細管内を流れる像が得られた。正常マウスでは、標識イヌリン投与 20 秒後の像にて、近位尿細管腔に標識イヌリンが確認できる。その後、標識イヌリンは 40 秒程度で遠位尿細管にまで流れ、体から排泄されていく。一方で、LPS マウス (6 時間後) においては、近位尿細管において標識イヌリンの滞留が生じ、遠位尿細管にまで流れ着く時間が延長していた (図3)。このとき、標識イヌリンが近位尿細管に流れ込む速度 (≒観察ネフロンにおける糸球体濾過速度) は溶媒群と LPS 投与群において差はなく、近位尿細管において尿流速が減弱していることがわかる。LPS 投与 24 時間後においては、全腎糸球体濾過量は減少しており、それを反映して、2光子顕微鏡像においても傍尿細管毛細血管において標識イヌリン由来蛍光が長く認められる。上記の通り、間歇的輸液蘇生は 24 時間後における BUN および 24 時間尿量を正常レベルにまで回復させるが、微小循環障害同様、間歇的輸液蘇生は LPS 投与 24 時間後におけるネフロン内尿流速の減少を防がなかった。

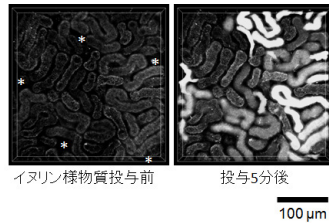


図3. 生体イメージングにより尿の流れを可視化した3次元像

静脈内 bolus 投与した蛍光色素（図では白）が近位尿細管において滞留している。アスタリスクは遠位ネフロン。

次に、LPS を蛍光色素で標識し、腎における局在を検討した。LPS は腎近位尿細管細胞に蓄積しており、24 時間後には細胞腫脹を伴う管腔狭窄を引き起こしていた。興味深いことに、既に尿流速の低下が確認できる LPS 投与 6 時間後において、管腔狭窄は認められなかった。すなわち、LPS 蓄積尿細管においては、管腔での尿の経路が確保されている時間帯においても、近位尿細管腔における尿流速減少が生じていた。さらには、原尿の近位尿細管管腔への流入速度は、LPS 蓄積の有無に関わらず、保たれているが、近位尿細管からの流出速度は LPS 蓄積尿細管において顕著に遅延していることが見出された。これらのことから、内毒素症および敗血症下での乏尿における初期現象として、近位尿細管における尿の滞留というポスト糸球体性のメカニズムが明らかとなった。

上記の近位尿細管への LPS 蓄積は、Toll-like receptor 4 (TLR4) の欠損あるいは TLR4 への結合部位である lipid A⁷⁾ を化学的に除去した LPS では生じず、近位尿細管における LPS/TLR4 経路が示唆された。重要な事に、サイトカインストームにおける主要メディエーターの 1 つである TNF- α のマウスへの投与あるいは LPS 投与マウスに対する TNF- α 中和抗体の処置は、尿流速に対して大きな変化は起こさなかった。ヌードマウスにおいては LPS による AKI 発症に個体間差が激しく、解析に堪えなかった。

次に、LPS によって生じる微小循環障害と尿流速減少の関係を調べた。LPS 蓄積尿細管と微小循環障害を起こした毛細血管との間に 3 次元局在関係は認められなかった。また、ヘパリン投与により微小循環障害は緩和されるが、尿流速は依然として減少したままであった。

考 察

AKI における乏尿・無尿のメカニズムに関して、GFR の低下以外に知られていることは少ない。われわれは、敗血症性 AKI 発症の一因として、LPS が近位尿細管管腔において尿流を停滞（尿を濃縮）させてしまうこと、それは近位尿細管における TLR4 の影響によるものであること、これらは輸液蘇生にて「見た目の AKI」を解除しても病態として存在し続けることを発見した。この近位尿細管における尿流停滞（尿濃縮）は、LPS により血圧や糸球体濾過が正常値の状態でもみられ、低血圧（ショック）や GFR の低下は、乏尿発生に必須の第一因子ではないことも証明された。

現在、臨床において生じている問題の一つとして、敗血症 AKI における良いマーカーがないという事実がある⁸⁾。本研究結果から、なぜマーカー探索が難航しているかについて、ひとつの理由を導き出せる。すなわち、現在臨床で使用されているマーカー（血清クレアチニン、血中尿素窒素、シスタチン C 等）は主に GFR 低下の結果、血中濃度が上昇するものである。今回、われわれは「GFR が保たれている段階から、近位尿細管において尿の流れが遅延する」ことを明らかにした。これは上記のマーカー群の糸球体における濾過が正常であっても、近位尿細管における滞留・濃縮が生じうることを指す。個体としては既に AKI を発症している段階であっても、これらのマーカーが上昇しないことの一つの原因と言えるであろう。現在、この観点から、どのようなマーカーがこの病態を反映できるか、検討中である。

本研究において、われわれはリアルタイムに尿細管内尿流を観察し、腎内における LPS の動態および生じる機能変化を明らかにした。この敗血症 AKI における乏尿のメカニズムを新規治療標的として、引き続き、敗血症 AKI 撲滅を目指し研究を続けている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、香川大学医学部薬理学講座の西山成である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Mehta RL, Bouchard J, Soroko SB, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM, et al. Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: Program to Improve Care in Acute Renal Disease. *Intensive Care Med.* 2011;37(2):241-8. doi: 10.1007/s00134-010-2089-9. PubMed PMID: 21152901; PubMed Central PMCID: PMC3028102.
- 2) Prowle JR, Kirwan CJ, Bellomo R. Fluid management for the prevention and attenuation of acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology.* 2014;10(1):37-47. doi: 10.1038/nrneph.2013.232. PubMed PMID: 24217464.
- 3) Nakano D, Kobori H, Burford JL, Gevorgyan H, Seidel S, Hitomi H, et al. Multiphoton imaging of the glomerular permeability of angiotensinogen. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(11):1847-56. doi: 10.1681/ASN.2012010078. PubMed PMID: 22997258; PubMed Central PMCID: PMC3482730.
- 4) Nishioka S, Nakano D, Kitada K, Sofue T, Ohsaki H, Moriwaki K, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is essential for the beneficial effects of renal ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* 2014;85(4):871-9. doi: 10.1038/ki.2013.496. PubMed PMID: 24336034.
- 5) Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, et al. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int.* 2003;64(5):1620-31. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00268.x. PubMed PMID: 14531793.
- 6) Legrand M, Bezemer R, Kandil A, Demirci C, Payen D, Ince C. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. *Intensive Care Med.* 2011;37(9):1534-42. doi: 10.1007/s00134-011-2267-4. PubMed PMID: 21695476; PubMed Central PMCID: PMC3155675.
- 7) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8. PubMed PMID: 9851930.
- 8) Doi K, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, et al. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1217-21. doi: 10.1681/ASN.2008060617. PubMed PMID: 19389851; PubMed Central PMCID: PMC2689892.