

腎疾患治療の新しい展開

松尾清一

名古屋大学医学部附属病院腎臓内科

key words : 尿細管間質障害, MCP-1, ミッドカイン, Toll-like receptor

要 旨

腎臓病の治療, 特に腎不全防止に関する治療を考える上で, 尿細管間質障害は重要な位置を占めている。それは, 尿細管間質障害の程度は腎機能の予後とより良く相関するからである。糸球体障害に関しては ACEI や ARB による血行動態的な治療が効を奏しているが, 尿細管間質の治療に関しては確立されたものがない。本稿ではいくつかの実験的なチャレンジを紹介しながら, 新しい腎障害治療法開発の可能性を探ってみる。

はじめに

——間質障害の重要性——

腎臓の機能を見てみると, 糸球体で濾し出される濾液(原尿)は正常成人で1日に150l以上にもなり, この中には尿素やクレアチニンなどの老廃物とともに水や電解質をはじめ生体にとって必要な物質が多く含まれている。糸球体以後のネフロン各部分ではこのような膨大な量の濾液から必要なものを選択的に再吸収し, 一方で不必要なものは吸収しないで排泄するという, 大変手間のかかる仕事をしている。すなわちネフロン働きの出発点である糸球体は単純な濾過機能を有するのに対して, 尿細管ははるかに複雑でかつエネルギーを要する作業を営んでいる。

実際に腎臓の組織を見てみると糸球体は腎皮質のごく一部を占める(実際には点在している)のに対して,

尿細管は腎組織の大部分を占めている。このことから腎機能に占める尿細管の位置はきわめて大きいものがあると想像できるが, 実際, 腎機能障害の程度や腎機能の予後は糸球体よりも尿細管間質障害の程度とより良く相関する。このことは古くは1970年に Shainuck らが報告¹⁾したとおりで, 最近に至るまで多くの臨床病理学的研究は彼等の説が正しかったことを証明している。また, すべての腎障害の進展に伴い間質障害が進行することも腎病理を見ているものにとっては明らかなことであるが, 腎生検時に間質の線維化が存在すると, その後の10年以上のフォローアップにおいて明らかに予後に差が出てくることが報告されている²⁾。

このように見てくると, 腎機能の保持のためには間質障害の軽減が有効である可能性があり, そのような治療法を開発するためには尿細管間質障害のメカニズムを解明することから始めなければならない。

1 間質障害の成り立ちと障害に関与する要素

これまで良く知られている尿細管間質障害の一般的な原因は, 直接的な因子として感染, 薬剤, 毒物, 免疫反応, 代謝異常, 遺伝病, 血液疾患, などがあげられる。また, 間接的な原因としては糸球体障害に続発するもの(たとえば蛋白尿や糸球体障害による血流不全など)や, 血管障害に続発するもの(虚血/再灌流障害等), 機械的な異常によるもの(尿管閉塞など)があげられる。

原因は様々であるが、実際に尿細管間質障害をきたす直接的な要素は共通するものが多く、以下のようなものが考えられる。すなわち、細胞性要素、液性要素、循環生理学的要素の三つである。

1) 細胞性要素

尿細管間質障害に関わる細胞として考えられているのは尿細管細胞それ自体、浸潤細胞、線維芽細胞である。特にこのうち近位尿細管細胞は様々な刺激により炎症や線維化惹起能を獲得し、しかも後に述べるようにマクロファージと同じくらいのポテンシャルを持っていることが多くの研究により確かめられている。したがって、糸球体におけるメサンギウム細胞と同様、その生物学的特性が分子のレベルで詳細に研究されている。

浸潤細胞はマクロファージ、好中球、リンパ球、好酸球などが障害惹起ないし進展に働く細胞としてあげられている。特に急性期では好中球、それ以後マクロファージやリンパ球が間質障害の主演となる浸潤細胞であろう。これらの細胞は後に述べる様々なサイトカイン/ケモカインや成長因子によって間質に遊走してくる。

線維芽細胞（ファイibroブラス）は尿細管細胞同様、種々の刺激でやはり障害惹起細胞へと変貌して腎障害を進展させる。

2) 液性要素

これには IL-2 や IL-6 などのサイトカイン、MCP-1 や RANTES などのケモカイン、TGF- β や PDGF などの成長因子、アンギオテンシン II などの内分泌因子、エンドセリンなどの血管作動性物質など、多くのものが含まれる。間質の炎症惹起（炎症性細胞浸潤の促進）と間質の線維化の促進が大きな作用である。治療のターゲットとしてこれらの物質の産生の抑制や中和を行うことで、腎障害の軽減が期待される。

3) 循環生理学的要素

血流障害/虚血、尿流障害、あるいは糸球体過剰濾過によって生じる尿細管負荷の増大などにより尿細管間質障害が惹起される。現在ではこれらによる間質尿細管障害は結局のところ、細胞性要素や液性要素によって媒介された障害であるとの認識で一致しているといっ

てよい。しかし、前記二者（細胞性要素、液性要素）、については実験的にはその有用性が証明されているものの、ヒトへの応用となるとまだ臨床的に解決すべき課題が多い。

循環生理学的要素はそれに比べて、アンギオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）やアンギオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）の使用、外科的手技などによって臨床的な応用がすでになされているという点で、重要である。

2 新規治療法開発のための基礎研究

1) toll like receptors (TLR)

慢性腎盂腎炎/尿路感染症はわが国では正確な統計はないが、米国では腎不全の原因の数パーセントを占めている重要な疾患である。ほとんどは大腸菌などのグラム陰性桿菌による逆行性感染により腎実質に繰り返し持続的に炎症を引き起こし、やがては間質線維化に至る。一体どのようなメカニズムでこのような現象が惹起されるのか？ また、最近注目されている近位尿細管細胞は感染とどのように関わり、また間質障害に貢献するのであろうか？

最近、グラム陰性桿菌の菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) の受容体として同定された TLR4 に注目して、このような疑問に対して一定の示唆を与える仕事を共同研究者の Tsuboi らが行っているので紹介しておく。

TLR はもともとショウジョウバエの背腹方向決定のための遺伝子として同定されたのだが、LPS に対して抵抗性のある C3H/HeJ マウス（以下 HeJ マウス）に TLR4 の遺伝子変異（712 番目のプロリンがヒスチジンに変異）が見つかり、LPS に感受性のあるワイルドタイプである C3H/HeN マウス（以下 HeN マウス）と比較すると、これが LPS に対する感受性を決定していることがわかりにわかに注目された。その後の研究で、TLR4 は CD14 とともに LPS の受容体となり、細胞内にシグナルを伝え、その結果種々の反応を細胞に引き起こすことが明らかになった²⁾。

Tsuboi らは、マウス近位尿細管細胞で TLR の発現を調べて、LPS のレセプターである TLR4 のみならず、グラム陽性桿菌菌体成分であるリポプロテインに対する受容体である TLR2 も近位尿細管細胞が発現していることを明らかにした。

次に Tsuboi らは、LPS（もしくは LPS 中の有効成分である lipid A）を用いて、次のような実験を行った。すなわち、TLR4 に変異の見られない野生型である HeN マウスと TLR4 に変異のある HeJ マウスからそれぞれ近位尿細管を単離培養して、LPS または lipid A 刺激を加えた。すると、HeN マウスではマクロファージに匹敵する量のケモカインが産生されるのに対して、HeJ マウスではまったく反応が見られなかった。測定したケモカインは MCP-1 と RANTES であるが、それぞれ、マクロファージとリンパ球の遊走を惹起することが知られているので、少なくとも近位尿細管はグラム陰性桿菌由来の LPS (lipid A) により TLR4 を介してケモカイン産生を行い、間質の炎症の成立に関与することが示唆された。

また、単離近位尿細管細胞培養系においてグラム陽性菌由来の lipoprotein 刺激実験では、野生型マウス由来細胞においてケモカインの産生が有意に上昇するのに比べて、TLR2 欠損マウス由来細胞ではまったく反応が見られなかった。グラム陽性菌は逆行性感染の原因となることは稀であるが、それ以外の感染症の後に腎障害を惹起することは臨床的にしばしば経験することであり、感染症を契機にした腎機能悪化の一因として、TLR2 を介した炎症惹起反応に関与している可能性が示唆された³⁾。

今後、ヒトにおいてこのようなメカニズムが働いているかどうか、また、治療への応用の可能性、などにつきさらに深い検討が必要と思われる。

2) midkine (MK)

MK は名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学講座村松喬教授らのグループによって発見された新しい成長因子である⁴⁾。MK は発生過程の midgestational stage において腎臓と脳に発現する遺伝子であり、出生後にはその発現はほとんど見られなくなる。分子量 38 kD のシステインに富むヘパリン結合性を有する分泌型蛋白質である。MK についてはこれまで多彩な作用が知られており、その中で共同研究者の Sato らは細胞遊走因子 (chemoattractant) としての作用に注目して腎臓における MK の役割を明らかにした。

このような研究を始める直接のきっかけになったのは、マウス頸動脈の balloon injury において血管 (内皮細胞+血管平滑筋細胞) に MK 発現の増強が見

られ、MK 欠損マウスでは野生型に比べてきわめて障害が軽減されるという興味深い研究に触発されたからである。また MK 欠損マウスにあらかじめ MK を腹腔内投与しておく、balloon injury は野生型マウスと同程度になることも確かめられ、その過程におけるマクロファージや好中球の浸潤が MK 欠損マウスで有意に軽減されることも明らかになった。Boiden chamber を用いた in vitro の実験でも、MK はマクロファージや血管平滑筋細胞の遊走を直接惹起させることが明らかにされた⁵⁾。

これをうけて Sato らはマウスに虚血再灌流障害モデルを惹起し、虚血再灌流後、近位尿細管細胞において MK の発現増強を認めた。さらに MK 欠損マウスでは野生型マウスに比べて尿細管間質障害が有意に軽減されていることを観察した。その時の細胞浸潤の程度はやはり明らかに MK 欠損マウスで軽かった。In vitro 近位尿細管細胞培養系において、活性酸素 (H_2O_2) 刺激によって MK の発現が増強すること、MK で細胞を刺激すると MCP-1 や MIP-2 などのケモカインの産生が有意に増加すること、が明らかになった。MCP-1、MIP-2 はそれぞれ、マクロファージや好中球を遊走させる因子であり、腎間質炎症の成立には不可欠の分子である。したがって、Sato らの研究により、MK は細胞を直接遊走させるだけでなく、近位尿細管細胞のケモカイン産生を刺激することにより激しい細胞浸潤を惹起することがわかった (図 1)⁶⁾。

次に Sato らは腎の虚血再灌流時に MK 産生を抑制することにより尿細管間質障害を軽減できるか否かについて検討を行った。細胞内における MK 産生を抑制する方法として、MK のアンチセンスを用いてメッセージ RNA (mRNA) をブロックすることがあげられるが、Sato らは MK にたいするアンチセンスオリゴ DNA (AS-ODN)⁷⁾を直接静脈内投与することによって、近位尿細管細胞の MK 産生抑制が可能か否かを検討した。その結果、静脈内投与された MK AS-ODN は肝臓と腎臓でピックアップされ、腎臓では近位尿細管に限局して存在することがわかった。おそらくこれは投与された AS-ODN が糸球体で濾過された後、近位尿細管細胞にて再吸収されたためと考えられた。実際の実験では虚血再灌流障害後 1 時間の時点で MKAS-ODN を静脈内投与した。近位尿細管細胞に取り込まれた AS-ODN は MK の発現を抑制し

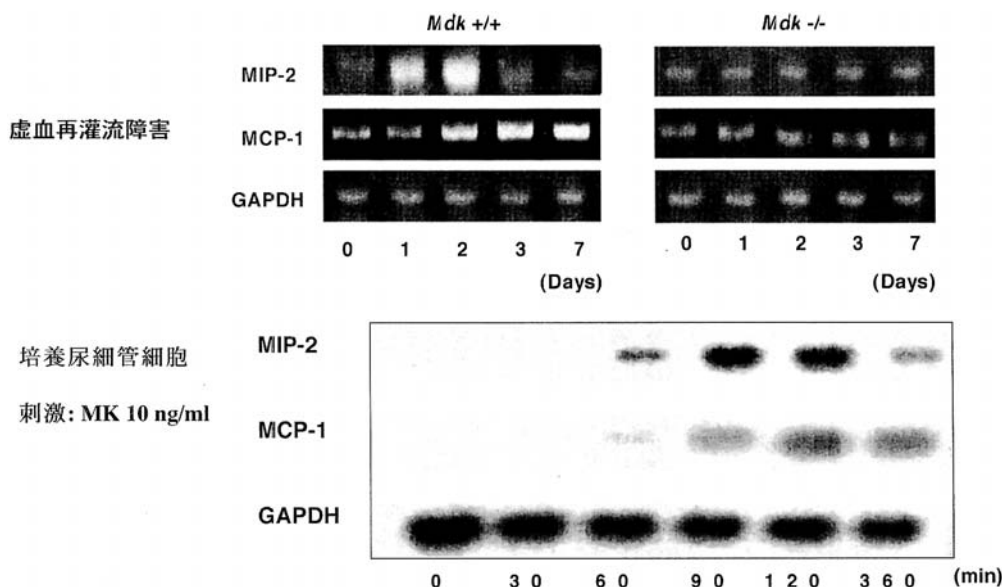


図1 MKによるケモカイン産生

て細胞浸潤を軽減させ、虚血再灌流後2日めでピークをむかえる尿細管間質障害を軽減させ、また生化学的な指標であるBUNやクレアチニンでみた腎機能低下をも軽減した⁸⁾。

これらの結果は、腎虚血再灌流障害において近位尿細管のMK発現増強が腎障害の発生に深く関わっており、その発現を抑制することによって障害を軽減させることを示している。MKは生後はほとんど体内には発現されておらず、腎障害時の腎臓にのみ特異的に作用する可能性がある。したがって、移植腎や種々の手術時における虚血再灌流障害の治療法として、将来アンチセンス療法が臨床応用される可能性があると思われる。また最近では、RNAレベルでの抑制をより特異的に効率良く行うものとしてRNA interference (RNAi) という方法が注目を集めている。これは短い二重鎖RNAでhelicaseとnucleaseを結合したRISC (RNA-induced silencing complex) を形成して、標的となるRNAに結合しそれを分解するものである。今後アンチセンス療法に代わる新しい治療法としての可能性が大いに期待されている⁹⁾。

3) macrophage chemoattracting protein 1 (MCP-1)

すでに述べてきたように、マクロファージは腎間質障害に大きな役割を果たしており、マクロファージの遊走因子としてのMCP-1は大変重要な分子であると

考えられている。これを直接押さえる方法は、これまで抗MCP-1抗体などで実験的に行われ一定の効果が認められている。しかし、全身的な影響はさけられず、免疫力低下などの副作用をもたらすかもしれない。

共同研究者のShimizu, Maruyamaらは九州大学のEgashiraらとの共同研究で、MCP-1と拮抗的にケモカインレセプターに結合してMCP-1の作用を抑制することが知られている変異型MCP-1 (7ND) を用いて、腎局所でMCP-1の作用抑制による腎障害軽減効果を検討した。研究に先立つ予備実験で、Shimizuらは腎静脈から逆行性に遺伝子プラスミドを注入する方法で、腎間質線維芽細胞 (interstitial fibroblast) に遺伝子導入する方法を確立し、この方法により、7ND遺伝子をラット左腎臓に導入した。このラットに大量の蛋白を負荷してprotein overload nephropathyを惹起させたところ、14~21日後にはコントロールでは蛋白尿による尿細管間質障害と線維化が明瞭に観察されたのに対し、7NDを遺伝子導入した群では有意に障害が軽減されていることがわかった。そのメカニズムとしては遺伝子が導入された線維芽細胞から7NDが細胞周囲に分泌され、マクロファージなどの遊走を抑制したものと考えられる。対照となる右腎臓には遺伝子は導入されておらず、全身への影響もなかった。すなわち、左腎臓局所でMCP-1の作用を押さえ、障害を減少させたと考えられた¹⁰⁾。より大きな動物の腎臓への遺伝子導入の方法

などは今後十分検討を要する問題であるが、腎局所への治療法として注目して良い結果である。

4 おわりに

——腎不全の発症防止への今後の展望——

進行性腎障害の治療という点に関して、これまで蛋白制限や ACEI/ARB の使用による血流動態の面からのアプローチは飛躍的に進み、かつまた、現実的な成果をあげてきている。一方で、腎障害進展の中心的な機構である近位尿細管の活性化や、種々のサイトカイン/ケモカイン/成長因子といったものをターゲットにすえた治療法の開発は大幅に遅れている。実験的には数えきれない程の研究がなされていて、華々しい成果をあげているにもかかわらず、臨床へのアプローチが遅れているのはおそらくヒトへの応用の方法論に関する研究がなかったからであろう。今後、このような点に留意しつつ、研究のブレークスルーが期待される。そして今後の研究を考える上で次のような課題がある。

1) 腎再生

腎臓は現時点では一定以上のネフロンを失うと、もとの疾患の活動性がなくなっても自動的に腎不全に至ると考えられている。このような状態からの回復、ないし、腎機能を長期にわたり悪化させない治療法の開発がすすめば、腎不全に至る患者が大幅に軽減できると期待される。

2) 腎疾患感受性遺伝子の同定

同じ刺激や障害を受けても、腎障害の発症や進展には大きな個人差がある。おそらくその原因は腎疾患感受性遺伝子といったようなものが存在して、腎疾患の発症、進展に決定的な影響を及ぼしているものと推測される。このような遺伝子は単一ではなくかなり複雑なネットワークを形成していると思われるが、将来このような遺伝子が同定されれば、予防や治療法の選択の上で大きな利益が期待される。

これらはいずれも至難な課題であるが、多くの優秀な若手研究者がチャレンジするテーマとして不足のないものである。今後の研究の進展を期待したい。

文 献

- 1) Schainuck LI, Striker GE, Cutle RE, et al: Structural-functional correlations in renal disease. Part II. The correlations. *Hum Pathol*, 1; 631, 1970.
- 2) Zhang G, Ghosh S: Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, 107; 13, 2001.
- 3) Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, et al: Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*, 169; 2026, 2002.
- 4) Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T: cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation atages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestational period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 151; 1312, 1988.
- 5) Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, et al: Neointima formation in a model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest*, 105; 489, 2000.
- 6) Sato W, Kadomatsu T, Yuzawa Y, et al: Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulo-interstitium in ischemic renal injury. *J Immunol*, 167; 3463, 2001.
- 7) Takei Y, Kadomatsu K, Matsuo S, et al: Antisense oligonucleotide targeted to midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res*, 61; 8486, 2001.
- 8) Sato W, Yuzawa Y, Kadomatsu K, et al: Midkine expression in the course of nephrogenesis and its role in ischaemic reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*, 17(Suppl 9); 52, 2002.
- 9) Kitabwalla M, Ruprecht RM: RNA Interference—A New Weapon against HIV and Beyond. *N Eng J Med*, 347; 1364, 2002.
- 10) Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, et al: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J Am Soc Nephrol* (in press).