

論文の内容の要旨

論文題名 急性腎障害に伴う急性肺障害（AKI-induced ALI）における
好中球エラストラーゼの関与の検討

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

石井 智子

背景および目的

急性腎不全（Acute Renal Failure : ARF）とは、急速な腎機能低下により体液の恒常性が維持できなくなり、高窒素血症、体液過剰、水電解質異常、その他腎不全症状をきたす症候群である。保存的治療しかなかった 1940 年代では、ARF による死亡率は 80～90%以上であったが、血液浄化療法の発達により死亡率は 30～50%へと劇的に改善した。しかし、その後数十年間は治療成績の改善がなく、ICU 患者においても約 6%が ARF を呈していることから、いまだ克服されていない疾患の一つと認識されている。また、血清クレアチニン値がわずか 0.3mg/dl ほど上昇しただけで死亡のリスクは 4.1 倍にも上昇するという大規模観察研究での報告があり、わずかな腎機能低下が予後不良因子となるため、早期より治療介入して予後改善に努めることが強調されるようになり、急性腎不全を形態的かつ機能的な腎障害と捉え、急性腎障害（Acute Kidney Injury : AKI）という概念が最近提唱されるに至った。

AKI は単に腎臓のみの障害だけではなく、AKI により遠隔臓器である肺・心臓・脳などさまざまな臓器に影響を及ぼすことが知られている。AKI に合併する他臓器障害と生命予後を検討した報告では、AKI に急性肺障害 (Acute Lung Injury : ALI) を合併した場合は特に予後不良となり、その死亡率は 80%以上に及ぶ。近年、動物モデルにおいて急性腎障害に伴う急性肺障害 (AKI-induced ALI) の研究が進められ新たなメカニズムが判明し注目されている。AKI-induced ALI としては、古くは 1950 年代より “尿毒症肺” が知られており、“volume overload によるうっ血した肺毛細血管の透過性亢進” 状態を反映しているものと考えられていた。しかし、最近では volume overload 以外のメカニズムがあり、Kidney-Lung Crosstalk として炎症・自然免疫・酸化ストレス・アポトーシスなどの関与が指摘されている。げっ歯類で AKI-induced ALI の発症機序に関する研究が散見されるが、AKI のモデルとしては腎虚血再灌流あるいは両腎摘出 (bilateral nephrectomy: BNx) モデルを用いた報告が主流であり、どちらのモデルにおいても肺障害の特徴として好中球浸潤が挙げられている。

ALI において、好中球はプロテアーゼや活性酸素種 (reactive oxygen species:ROS) の放出など病因に関する中心的な役割を果たしているが、その中でも特に好中球エラスターゼ (neutrophil elastase: NE) は ALI の病態改善のため治療介入できるターゲットと考えられている。NE は分子量約 30 kDa の中性のセリンプロテアーゼであり、好中球のアズール顆粒 (ライソゾーム) に存在する糖蛋白である。正常では、 α 1-アンチトリプシンなどの内因性プロテアーゼインヒビターが大量に存在し、NE 活性は厳密に制御されている。しかし、炎症局所や感染病巣では、NE と内因性プロテアーゼインヒビターとの量的、あるいは質的な不均衡が生じることにより NE が組織傷害を引き起こすと考えられている。重要な問題点として、NE はバクテリアのみならず宿主組織も破壊することである。

NE 特異的阻害剤であるシベレスタットナトリウム水和物 (sivelestat sodium hydrate: ONO-5046、エラスポール®) は日本で認可・販売されている薬剤である。日常臨床においては、“全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome:SIRS) に伴う ALI ” において保険適応となっており、ONO-5046 の保護的効果が報告されている。

これまで、過去の報告では AKI-induced ALI についての ONO-5046 の効果を証明した研究は存在しない。本研究では AKI-induced ALI の特徴として好中球浸潤が挙げられる点に注目し、マウス BNx モデルを用いて AKI-induced ALI における NE の関与および炎症性サイトカインの変化について ONO-5046 を用いて検討することとした。また、ONO-5046 の生命予後延長効果についても検討を行った。

方法

8~10 週齢の C57BL/6 マウス (雄) を使用し、BNx により AKI モデルを作成した。BNx マウスに ONO-5046 を投与した群 (BNx+ONO-5046 群)、BNx マウスに生理食塩水を投与した群 (BNx+saline 群)、コントロールとして疑似手術の群 (Sham 群) を用意し、BNx+ONO-5046 群は両腎摘手術の 11 時間前から 11 時間おきに ONO-5046 50mg/kg を、

BNx+saline 群と Sham 群に対しては生理食塩水を腹腔内投与した。両腎摘手術後から 6 時間あるいは 24 時間の時点で血液や肺組織を採取し各種解析を行った。なお、生存解析については同様の投薬・両腎摘手術のプロトコールであるが、ONO-5046 あるいは生理食塩水の投与は 11 時間ごとに継続してゆき、自然死を観察した。

結果

BNx により時間の経過とともに BUN は著明な上昇を認め、AKI モデルが作成できていることを確認した。

BNx 24h 時点での体重変化率 (%) と肺の湿乾重量比 (lung wet/dry ratios: W/D 比) は BNx+saline 群、BNx+ONO-5046 群、Sham 群の各群間には有意差は認めなかったことから、今回の AKI モデルでは明らかな volume overload の関与はないことが示された。

病理組織学的検討において、HE 染色では BNx+saline 群あるいは BNx+ONO-5046 群のいずれにおいても肺組織における間質の浮腫は認めなかった。抗好中球抗体 (anti-neutrophil antibody) による免疫染色では BNx+saline 群で BNx 6h, 24h とも好中球浸潤を認めたが、BNx 24h に比較すると BNx 後早期である 6h の方が顕著であった。また、好中球浸潤は ONO-5046 の投与により BNx 6h, 24h とも改善が見られることが示された。

肺における血管透過性亢進の指標となる BALF (bronchoalveolar lavage fluid) 蛋白は、BNx 6h では上昇を認めず、各群間でも有意差は認めなかった。一方、BNx 24h では BNx+saline 群では BALF 蛋白の上昇を認め、BNx+ONO-5046 群では低下を認めた。

BALF 沈渣の細胞数カウントでは、いずれの群も細胞数は正常範囲内であり有意差を認めなかった。それゆえ、塗抹標本においても、いずれの群でも好中球数の増加は認められなかった。

血漿 NE 活性は BNx+saline 群において BNx 6h の時点で上昇を認めたが、BNx 24h では低下していた。また、BNx 6h に関しては、ONO-5046 の投与によって血漿 NE 活性の有意な低下が認められた。BALF での NE 活性測定も行ったが、いずれの群でも測定感度以下であった。

抗 NE 抗体 (anti-NE antibody) による Western blot 解析結果では、BNx 6h と 24h において BNx+saline 群での肺組織での NE 蛋白発現の増加を認めた。また BNx 6h と 24h とも ONO-5046 の投与により NE 蛋白発現が抑制されていた。これらの結果はデンシトメトリー法による解析で有意差を認めた。

肺組織での炎症性サイトカインの関与を検討するため定量的リアルタイム PCR にて IL-6、KC、TNF- α の mRNA の発現量について解析した。これらのサイトカインの発現量はいずれも BNx+saline 群で上昇し、BNx+ONO-5046 群では低下していた。サイトカインの発現については BNx 24h に比較し、BNx 6h の方が顕著であった。

ELISA 法による血漿 KC (keratinocyte-derived chemokine) 測定は BNx 6h の時点で BNx+saline 群は顕著に上昇し、BNx+ONO-5046 群で低下していた。BNx 24h に関しては BNx+saline 群で低下をしていたため BNx+ONO-5046 群との有意差を認めなかった。血漿

KCの上昇についてもBNx 24hと比較し、BNx 6hの方が顕著であった。

生存期間についての検討では、本研究におけるAKIモデルは両腎摘（BNx）であるため自然経過において死亡は避けられない状態であるが、BNx+saline群とBNx+ONO-5046群を比較するとBNx+ONO-5046群の方が死亡までの生存期間に有意な延長がみられた。

最後に血中の肝酵素測定を行った。過去の報告と同様に、BNxマウスは有意な肝酵素（AST, ALT）の上昇を認めた。また、ONO-5046の投与により肝酵素の低下は認められなかった。

考察および結論

NE特異的阻害剤であるONO-5046は、本邦においてSIRSに伴うALIに対しての治療薬として使用されているが、本研究はマウスBNxによるAKI-induced ALIにおいても、その病態を改善することを示した。また、NEがAKI-induced ALIの発症機序において重要な役割を果たしていることが判明した。

BNxによるAKI-induced ALIモデルでは、体重変化率あるいは肺W/D比がSham群と比較し変化がなかったことより体液過剰状態は認めず、これは過去の報告とも一致した。また本研究におけるBNxモデルでは、病理組織所見における好中球浸潤像、血漿NE活性・肺組織のNE蛋白・BALF蛋白・肺組織の炎症性サイトカイン・血漿KCの上昇などを認め、これらの所見はONO-5046の投与により改善を認めた。またONO-5046による生命予後延長効果も認めた。

本研究におけるNEに関しては、BNx後早期の6hではBNx+saline群の血漿NE活性が上昇した。これは、BNxによる急速な腎機能低下によるAKIが、内因性NEプロテアーゼインヒビター不活性化のtriggerになっている可能性がある。また、内因性NEプロテアーゼインヒビターである α 1-アンチトリプシンや α 2-マクログロブリンは肝臓で産生されているが、BNxによる肝障害や肝機能低下による内因性プロテアーゼインヒビターの産生低下もNE活性化のtriggerになっている可能性も挙げられる。血漿NE活性は24時間後にはSham群とほぼ同程度まで低下したが、これは過去の報告で血清IL-6や血清KCがBNx 24hでSham群のレベルまで低下していた結果と同様であった。また、Western blotにおける肺組織でのNE蛋白の解析では、BNxでNE蛋白の発現上昇とONO-5046の投与による発現低下を認めたが、これはNE蛋白が肺組織における好中球浸潤や好中球活性化を示唆する所見と思われる。

ONO-5046は、いくつかの動物モデルを用いたりポ多糖類（LPS）誘発性肺障害における炎症、血管透過性亢進や好中球浸潤を改善することが報告されているが、本研究で用いたBNxモデルは、LPS投与等の他のALIモデルと比較すると、ALIとしての変化はかなり軽度である。日常臨床におけるONO-5046の効果に関しては、有効性を証明できなかった報告（ALI患者492症例を対象としたSTRIVE study）もあるが、STRIVE studyでは高齢者あるいは重症例が多かったのではないかという問題点も一方では指摘されている。これらの議論より、肺障害が高度に進行した重症例に対してはONO-5046の効果は期待できないかもしれないが、本研究結果も踏まえるとALIでの早期使用や軽症例に対してONO-5046

は有効である可能性は十分にあることを示唆している。

これまで、AKI 合併の ALI 症例に対して ONO-5046 を評価した臨床研究の報告はなく、また AKI 発症というエピソードのみで ALI が既に生じている可能性があるという認識は広くは浸透していなかったものと考えられる。本研究では、AKI 発症のみで ALI が生じるという過去の報告に一致した所見を認め、AKI-induced ALI には好中球と NE が重要な役割を果たしており、AKI 発症早期より ONO-5046 を投与することにより ALI のみならず生命予後まで改善していることを示しており、日常臨床において AKI 合併の ALI 症例は死亡率が非常に高い状況を考慮すると今後注目すべき点と思われる。また ONO-5046 のみならず、AKI-induced ALI において NE 不活性化をターゲットにした治療戦略は新しい治療方法及び薬剤に発展してゆく可能性がある。今後はヒトの AKI 症例を対象に、早期の段階で ONO-5046 を投薬することで、その後の ALI の合併率減少や生命予後改善効果について臨床的な検討も望まれる。

結論であるが、BNx による AKI-induced ALI は好中球浸潤が特徴であり、今回の研究により肺への好中球浸潤と同時に、NE の活性化も関与していることが初めて示された。また、NE 特異的阻害剤である ONO-5046 は、AKI-induced ALI において血漿 NE 活性・血漿 KC、肺組織での好中球浸潤・NE 蛋白、血管透過性亢進や炎症性サイトカインを改善し、かつ ONO-5046 の生命予後改善効果を初めて明らかにした。これらの所見から、本研究は AKI-induced ALI において NE が重要な役割を果たしており、ONO-5046 の保護的な効果を初めて報告したものである。また、AKI-induced ALI において NE 不活性化をターゲットにした新たな治療法の創造は、今後の治療戦略の一つになる可能性が示唆される。