基礎からみた腎臓研究の最前線

西山 成*

〔要旨〕われわれは腎臓病の病態メカニズムを解析することによって得た実験的POC(proof of concept)に基づき、新しい診断・治療法の開発を目指している。例えば、腎臓の生理的機能やさまざまな病態メカニズムの解明を目的として多光子レーザー顕微鏡・生体バイオイメーシングシステムを国内で初めて導入し、得られた実験的POCに基づいて新しい治療法やバイオマーカーの開発に取り組んでいる。さらに最近、腎性貧血に対する新しい治療法として、ヒトiPS細胞からのエリスロポエチン産生細胞樹立に成功した。この細胞は、今後開発が進むエリスロポエチンに関連する薬剤の作用機序POCを得ることができる唯一のツールとなると考えている。今回は、これら多面的な腎臓に関連する基礎研究を紹介する。

キーワード：基礎研究、腎臓研究、POC(proof of concept)

はじめに

まず始めに、2016年11月に高知で横山正尚大会長が開催された日本臨床麻酔学会大会において、私の研究を発表させていただく機会をいただいたこと、そして座長の小坂誠先生や恩師の森田潔先生をはじめ、多くの皆さまにご聴講いただいたことを、この場をお借りして感謝申し上げます。

私の医師としてのスタートは、岡山大学の麻酔科蘇生科教室であったが、今になって自分を振り返ってみると、岡山大学での猛烈な臨床トレーニングが現在の私の研究活動、特に研究に対する姿勢に直結しているように思う。特に、医師としてのメンタリティーを徹底的に鍛えられた。今や宝物となっているその頃のメモ帳は日々の反省で隙間なく埋め尽くされている。そのメモ帳の1ページ目には、こう記されている。以下、私の手帳より抜粋：国家試験の

発表を待たずして麻酔科によるレクチャーが始まった。オーペンは、金城実先生に決定した。金城先生は開口一番に、「一年目に頑張らない医者とは、一生頑張れない医者になる。だから、今日からの一年間は、全て全力でやれ。」とおっしゃられた……。

そのとき私は、研修後に大学院での基礎研究のトレーニングを受けるキャリアプランを考えていたもので、最初数年の研修期間に他の同僚よりも努力する必要があると考えていた。そこで、私は金城先生の教えを守るため、一年間の目標として、手帳の1ページ目に次の3つの目標を書いた。「一つ、勤務日は最初に来て、最後に帰ること。一つ、犯したミスは二度と繰り返さないこと。一つ、患者に良いことは、全てやること」。たった3つの行動目標であったが、もちろん100%達成できるはずもない。ただ、目標を達成するために懸命に毎日を過ごした記憶だけは、今も鮮明に残っている。その後、大学院での

*香川大学医学部薬理学

著者連絡先 西山 成
〒761-0793 香川県木田郡三木町大字池戸1750-1
香川大学医学部薬理学

み基礎研究のトレーニングをするつもりが、いつの間にかそれを専門とするようになっていた私だが、麻酔科での臨床トレーニングは、研究者としての「絶対諦めない」という現在の姿勢につながっていると感じている。

私は腎臓の研究がしたいと思い、約4年の麻酔科研修の後、薬理学領域の大学院に進んだ。そして、留学などを経て2007年より香川大学医学部薬理学の教授に就任し、10年の歳月が経過した。しかし、腎臓の病態どころか、正常な機能さえもいまだ解明されていないような状況が続いており、決定的な診断・治療法の開発がまったく進んでいない。これに対してわれわれの研究室は、実験的POC(proof of concept; 確証的な証拠)に基づいた腎臓病に対する診断・治療薬の開発に取り組んでいる。本稿では、まずわれわれの研究スタイルについて概説し、その後、いくつか具体的な取り組みを紹介させていただく。

I 香川大学医学部薬理学の研究方針

私は、2007年2月より香川大学医学部薬理学の教室を担当することになったが、教室の方針として、研究・教育・社会貢献をどのように進めていくべきかについて考えた。まず私は、教室の研究理念として、「多くの仲間と一緒に、世界最先端の社会貢献につながる研究を続けていくことが我々の願いです」というポリシーを掲げた。これには特に大きな意味はなく、とにかく楽しくモチベーションを持って、夢を諦めずに研究を続けたいという自分の願望を言葉にただけである。しかし、その一方で、研究環境の現実は大変厳しいものであった。私の就任時に教員ポストをいきなりカットされ、膨大な学内業務に忙殺される日々が始まった。休みもほとんど取らず、何とか研究のアクティビティは維持しているつもりであったが、小さな地方大学の基礎研究室で新しい腎臓病の診断・治療薬を開発するためには、違った視点からの画期的な「何か」が必要であると

感じていた。そこで、私が思い立ったのは非常にシンプルな研究方針であった。それは、新しい腎臓病の診断・治療薬ができないのは、腎臓の機能や病態メカニズムが解明されていないからではないのか？ここは一度しっかりと基本に戻って、腎臓病の病態生理を明らかにすることによってターゲットを定め、「実験的な確証的証拠、すなわちPOC(proof of concept)を持って新しい診断・治療法の開発を進める必要があるのではないか？」と思うに至ったのである。

しかし、そのような新しい発想や創薬ターゲットは、すぐには見つかるはずもない。そこで私が考えた具体的な方策は、これもまた非常にシンプルに現有する教室の人的資源を最大に活用するということであった。具体的には、すべての教室員を一度異分野に送り出して新しい研究分野を開拓し、それらをフィードバックして統合することによって、新しい研究分野を作り出すというイメージである。この構想をまとめて準備を進め、スタートできたときには、教授就任からはや5年が経過していた。予想されていたことではあったが、この方策の実行は私自身にとって大変辛いものであった。ただでさえ少ない教室員を外に出すということは、当然、残りのメンバーの負担が大きくなってしまう。実際、私以外の教員は複数回の留学をしており、私一人がすべての教室業務をこなす期間も長くあった。

思い切った研究方針の転換を図ってから今年で5年が経過し、私が教室を担当してから節目の10年目となった。幸い、いくつかの成果が出始めたので、その一部を以下に具体的に紹介したい。

II 腎臓内レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system : RAS) に関するPOCと新しい診断・治療法の開発

アンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme : ACE)阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬(angiotensin receptor blocker : ARB)などの

図1 腎内レニン・アンジオテンシン系(RAS)の調節メカニズム

腎臓では局所でアンジオテンシンIIが活発に産生されている。血中と比較して腎臓内ではレニン活性が非常に高い。しかしその一方で、肝臓で大量に産生されて血中に分泌されるアンジオテンシノーゲンと比較して、腎臓内局所で産生されるアンジオテンシノーゲンの量は非常に少ない。したがって、腎臓で産生されるアンジオテンシンIIは、局所のアンジオテンシノーゲンの量によって規定されるものと考えられている。そのため、尿中アンジオテンシノーゲンは腎臓内のアンジオテンシンII産生量を予測できるバイオマーカーであると考えられる。

RAS阻害薬は、蛋白尿を生じる慢性腎臓病(chronic kidney disease : CKD)では有用な薬剤として認識されている。私達も1990年代にARBが腎保護を示す薬理学作用機序などを解明してきた。腎臓には独自のアンジオテンシンII産生の調節機構が存在し、腎臓の組織内では大変高濃度で存在しており、これが高血圧や腎臓病の原因になることを実験的に証明したことが、腎保護薬としてのRAS阻害薬の基礎的なPOCとなった¹⁾。一方で私達は、腎臓組織内で産生されるアンジオテンシンIIは、局所で発現するアンジオテンシノーゲンによって調節されていることを明らかにした(図1)。次いで、尿中のアンジオテンシノーゲンの測定法を開発し、臨床的に腎内のRAS活性を予測することに成功した。この測定技術は、すでに臨床応用されており、さまざまな腎臓病のバイオマーカーになることが期待されている。

このように、腎臓内RASは局所のアンジオテンシノーゲンによって調節されているという基礎的POCを得ることにより、これを腎臓病のバイオマーカーの開発につなげている²⁾。今後は、RAS以外をターゲットにした研究も含め³⁾、腎臓病を早期に発見し、予後を予測できるようなバイオマーカーの開発を進めていきたい。

Ⅲ 腎臓の病態生理のPOCと新しい診断・治療法の開発

腎臓は解剖学的にも機能的にも非常に複雑な臓器である。私は腎機能の制御メカニズムの解明を目指して長年研究を進めてきたが、決定的と言えるものがなかった。そこで、腎臓の可視化によって機能調節の根本を明らかにすることが病態解明のブレイクスルーにつながると考え、米国の友人より「多光子

レーザー顕微鏡を使用して腎臓を可視化するテクニックを開発した」と聞きつけた際、直ちに助教の中野大介博士を留学させ、この技術を国内で最初に輸入することに成功した⁴⁾。この手法は、生きている動物の糸球体内血行動態や糸球体濾過、さらには尿細管の尿流量などを測定できる技術であり、腎臓を機能レベルで正確に可視化することを可能とする。この手法によって、私達はこれまで考えられなかったような腎臓で生じるさまざまな現象を目の当たりにすることとなった。

例えば、敗血症の際には急性腎傷害(acute kidney injury : AKI)が生じるが、多光子レーザー顕微鏡で観察してみると、大変驚いたことに軽度の敗血症では糸球体で尿はしっかりと濾過されるが、それが遠位尿細管までは到達せず、近位尿細管から間質に大量に流れ込んでいると考えられる画像が得られた⁵⁾。私達はこの敗血症による「尿のリーク」を抑制できる薬効評価を進め、心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide : ANP)がこれを軽減するという事を見出した(2017年日本麻酔科学会学術集会にて優秀賞受賞)。急性心不全の治療薬であるANPであるが、現場では乏尿の際に使用されることが多い。この作用メカニズムとして、敗血症の際にANPが「尿細管で生じている尿の間質へのリークを抑制して尿量を増加している」というPOCをつかむことができたので、今後はこれを臨床応用につなげていただきたい。

IV 新しい体液コントロールメカニズムとPOC

私はICUでのトレーニングの中で、「全身管理を極めたい、そのため体液調節をもっと学びたい」と思い、腎臓生理学者で最も有名なGuyton先生の一弟子であったGabriel Navar先生のもとに留学した(そのため、私は自称Guyton先生の孫弟子である)。Guytonグループはナトリウムと体液についての研究を数多く実施し、非常に合目的、かつ精密なナトリウムと体液バランス理論を提唱している。そ

して現在では、それらすべてが当たり前のように全医学生、ならびに医師に教育されている(私もそう教育している)。例えば、「細胞外液中のナトリウム濃度は常に一定に保たれている。少しでもナトリウムが身体に貯留したとしても、水が入ってきて細胞外液中のナトリウム濃度は保たれる。また、それに身体が反応して血圧の上昇やRASの不活性化が生じ、腎臓での水・ナトリウムの尿中排泄が増加する」と教えている。ところが数年前、「ナトリウムは皮膚に蓄積し、免疫細胞を介して高血圧を生じている」ということが、ドイツ人のTitze先生らにより報告された⁶⁾。Guyton一派であった私にとって、この報告は実に大きな衝撃であった。何よりも、規定概念に囚われないTitze先生の発想の豊かさにショックを受けた。そして、早速アプローチを開始し、大学院を卒業した北田研人博士を彼のもとに留学させることに成功した。

ところが、北田博士が留学したその当日に、「予定していた実験で使用するマウスが感染を起こして全滅」という悲しいメールが入った。予定していた動物実験をできなくなった北田博士は、仕方なく以前にTitze先生がロシアで実行した臨床データを解析するとのことであった。それが宇宙飛行士を目指す健康なロシア人を長期間拘束し、一定量の食塩の入った食事を与え、毎日尿を採取してナトリウムを測定したという研究だったのである。そのような臨床データを解析していると、北田博士は食塩を多く含む食事を食べても飲水量が増えていないことに気づいた。これは、「塩辛いものを食べるとのどが渇いて水を飲む、そしてたくさん尿が出る」という常識にまったく反するものであった。その後、北田博士は動物実験でそのPOCをつかみ、2017年5月号のJ Clin Invest誌に論文を報告した⁷⁾。その号の表紙には前述の中野博士の*in vivo*イメージングの写真が使用され、ニューヨーク・タイムズ誌などでもかなりセンセーショナルに取り上げられた。さらに、2017年のJ Clin Invest誌で最も読まれた論文に選

図2 ヒトiPS細胞より樹立したエリスロポエチン産生細胞

われわれは、ヒトiPS細胞にさまざまな刺激を加え、さまざまな刺激に反応し、持続的にエリスロポエチンを産生して細胞外に分泌する細胞の樹立に成功した。本細胞は、エリスロポエチンの発現、産生、分解などの機序を解明する唯一のツールになるものであると考えられる。

出されるに至った。

北田博士はTitze先生の移動に伴い、現在一時的に帰国して当教室で実験しているが、身体の上のナトリウムの含有量は均一ではなく、腎臓のさまざまな病態でいろいろなところに変化していることを見出している。今後はこれがどのように腎臓病をはじめとする疾患に関与しているのかを解明し、新しいPOCを得ていくプロジェクトを進めていきたい。さらに、ドイツで開発されたナトリウム測定用のMRI、さらには香川大学が得意とする分光イメージングなどの開発も進め、臨床的な新しい体液評価法の開発も進めていきたいと考えている。

V ヒトiPS細胞からのエリスロポエチン産生細胞樹立によるPOC

最後に腎臓の再生について少し話をさせていただく。ノーベル賞を受賞された山中伸弥先生は、私の先代の安倍陽一名誉教授の出身教室である大阪市立大学医学部薬理学で学位を取られたということもあ

り、個人的に以前より存じ上げていた。そこで、iPS細胞の研究が発表された直後より、助教の人見浩史博士(現在、准教授)を京都大学iPS細胞研究所の長船健二教授のもとに出向させ、腎臓の再生プロジェクトに参加させた。

腎臓は20種類以上の細胞から作られる複雑な解剖で構成されており、制御機構も複雑であることから、最も再生しにくい臓器であると言われている。実際、京都大学iPS細胞研究所においても、iPS細胞から段階的に細胞を分化させ、ようやく腎臓前駆細胞ができた段階である⁸⁾。国内外の他施設でも腎臓の再生は進んでいるが、実用化には程遠い。このような研究状況においてわれわれは少し視点を変え、まずは臨床応用できることから始めようと考えた。これを、「身の丈に合った再生プロジェクト」と名付け、腎臓自体の再生ではなく、腎臓で産生されるエリスロポエチンを産生する細胞をiPS細胞から作ることを試みることにしたのである。

エリスロポエチン産生細胞をiPS細胞から分化さ

せる方法も、オーソドックスではない方法を取った。多くの場合、実際の臓器の発生と同じメカニズムを利用し、iPS細胞やembryonic stem細胞を段階的に成熟な細胞へと分化させていくが、われわれはマルチ・スクリーニングで一気にエリスロポエチン産生細胞に分化させる方法を選んだ(図2)。すなわち、iPS細胞に何千種類もの化合物やペプチド・ホルモンなどを加え、少しでもエリスロポエチンの遺伝子発現が増加したものがあれば、それらを組み合わせ、一番効率のよい方法を見出そうというものである。この方法により、iPS細胞からエリスロポエチン産生細胞へ分化させることに成功し、動物実験などでも貧血改善の効果が確認できた。本研究はScience誌主導の国内2例目となるpress releaseが実施され、世界中で大きな注目を受けているが、現在、この細胞から産生されたエリスロポエチン、あるいはこの細胞の移植の臨床応用に向けて研究が続けている。一方、この細胞は、今後開発が進むエリスロポエチンに関連する新規薬剤の作用機序POCを得ることができる唯一のツールとなると考えており、その研究展開が期待されている⁹⁾。

おわりに

本稿では、腎臓研究の最前線について、私達の研究室の取り組みの一部を紹介させていただいた。ここで紹介した研究以外にも、既存薬の腎保護作用を検討するという、育薬を目指した古典的な薬理学研究から、ゲノム修復に着目した無謀なチャレンジも続けている。近い将来に社会に貢献できることを夢

見て、教室員一同で腎臓病をはじめとしたさまざまな疾患に対する新しい診断・治療薬の開発を目指していきたい。

参考文献

- 1) Kobori H, Mori H, Masaki T, et al. : Angiotensin II blockade and renal protection. *Curr Pharm Des* 19 : 3033-3042, 2013
- 2) Kobori H, Nangaku M, Navar LG, et al. : The intrarenal renin-angiotensin system : from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59 : 251-287, 2007
- 3) Arai S, Kitada K, Yamazaki T, et al. : Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat Med* 22 : 183-193, 2016
- 4) Nakano D, Nishiyama A : Multiphoton imaging of kidney pathophysiology. *J Pharmacol Sci* 132 : 1-5, 2016
- 5) Nakano D, Doi K, Kitamura H, et al. : Reduction of tubular flow rate as a mechanism of oliguria in the early phase of endotoxemia revealed by intravital imaging. *J Am Soc Nephrol* 26 : 3035-3044, 2015
- 6) Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, et al. : Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest* 123 : 2803-2815, 2013
- 7) Kitada K, Daub S, Zhang Y, et al. : High salt intake re-prioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J Clin Invest* 127 : 1944-1959, 2017
- 8) Mae SI, Shono A, Shiota F, et al. : Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 4 : 1367, 2013
- 9) Hitomi H, Kasahara T, Katagiri N, et al. : Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. *Sci Transl Med* 9. pii : eaaj2300, 2017

Basic Forefront Research in the Field of Nephrology

Akira NISHIYAMA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kagawa University

We have worked to develop new diagnostic and therapeutic tools based on experimental proof-of-concept obtained through the analysis of pathological mechanisms underlying kidney diseases. For this purpose, for the first time in Japan, we introduced multiphoton laser microscopy with an *in vivo* bio-imaging system that revealed physiological functions of the kidney and various pathological mechanisms. We used these findings to develop new therapeutic means and biomarkers. In addition, we successfully established erythropoietin-producing cells from human iPS cells as a new therapeutic tool for renal anemia. Further development of erythropoietin-related drugs is expected in the future. We believe that these cells represent the only tool to help obtain proof-of-concept for mechanisms of action of such drugs. Here we discuss these kidney-related, multifaceted basic studies.

Key Words : Basic studies, Nephrology, POC (proof of concept)

The Journal of Japan Society for Clinical Anesthesia Vol.38 No.3, 2018