シンポジウム

3. 臓器の線維化とその治療

2) 腎臓の線維化とその治療

岡田 浩一

Key words : 蛋白尿, 低酸素, TGF- β , Renin-angiotensin系阻害, Keap1-Nrf2系

はじめに

腎線維化は慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) が末期腎不全への過程でたどる最終共通路であり, 慢性腎不全 (chronic renal failure) に対応する尿細管の萎縮と間質の線維化を主体とした組織変化である。現在, 日本では毎年 3 万人の患者が維持透析に導入されており, 原因疾患によらない進行したCKDに共通する組織変化である腎線維化は, 透析導入を阻止するためのよい治療標的と考えられる。

1. 腎線維化の重要性

末期腎不全へと進展するCKDの三大原疾患は, 糖尿病性腎症, IgA腎症を代表とする慢性糸球体腎炎と加齢性変化を含む腎硬化症である。その他にも難治性ネフローゼ症候群, 膠原病・自己免疫疾患や遺伝性疾患などがあり, いずれも病初期には疾患特異的な腎組織所見を示すが, 慢

性腎不全状態となり機能が廃絶していく過程で, 嚢胞性腎疾患を除くといずれも糸球体硬化, 尿細管萎縮および間質線維化という萎縮腎に共通した組織所見に収斂していく。以前より, 間質線維化の程度は糸球体硬化の程度に比較して, 腎生検時の腎機能および機能予後により強く相関することが示されている¹⁾。また慢性腎不全における腎性貧血は腎臓におけるエリスロポエチン (EPO) 産生低下に起因するが, 近年, EPO産生細胞が産生能を喪失しつつ, 線維化病巣を構成する線維芽細胞に形質転換する可能性が示されており²⁾, この仮説により腎線維化の進展と腎性貧血の進行の関係が説明される。これらのことから, 間質線維化は進行したCKDの慢性腎不全状態に対応する組織変化であり, 末期腎不全への進行を抑制するための普遍的な治療標的と考えられる。

2. 腎線維化のメカニズム

上述のように腎線維化の程度は腎機能予後と

埼玉医科大学腎臓内科

111th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine: Symposium: 3. Fibrosis of the viscera and its treatment; 2) Renal fibrosis and anti-fibrotic therapy.

Hirokazu Okada : Department of Nephrology, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Japan.

本講演は, 平成 26 年 4 月 13 日 (日) 東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

図 1. マウス閉塞性腎症（第 7 病日）に対するALK5 阻害薬の腎線維化抑制効果（マッソントリクローム染色，200 倍）

マウス閉塞性腎症モデルに対し，ALK5 阻害薬（SB-525334）を 10 mg/kg/日投与してTGF-β1 型受容体作用を抑制し，7 日目に腎組織変化を評価したところ，有意に間質線維化が抑制されていた。

有意に相関することから，腎機能低下の危険因子との関連性が推定される．腎機能低下の危険因子として最も重要なものは蛋白尿であり，多くの臨床研究によって蛋白尿が末期腎不全の独立した危険因子であることが示されている³⁾．その理由の 1 つとして，多くの基礎研究が蛋白尿による尿細管上皮細胞の活性化・形質変化を介して間質線維化が惹起されるメカニズムを検証している．尿蛋白の主成分であるアルブミンそのものの尿細管上皮細胞への影響は軽微と考えられており，アルブミンに結合している脂肪酸などの分子や非選択性の蛋白尿に含まれる補体や免疫グロブリンなどの尿中成分に間質線維化惹起性が担われていると推定される⁴⁾．また，我々はCKDの進行に並行してヒト腎間質の低酸素状態が惹起されることをblood oxygenation level-dependent MRIを用いて明らかにした⁵⁾．低酸素の原因としては，糸球体病変自身およびそれに由来する血管作動性物質による糸球体毛細血管～輸出細動脈血流の低下，間質線維化による尿細管周囲血管網の減少および蓄積する細胞外マトリックスによる酸素拡散能の低下などから酸素供給能が減少し，その一方で上述の尿中成分による尿細管上皮細胞の活性化から酸素需要が充

進するためと説明される⁶⁾．

尿蛋白や低酸素の作用により，尿細管上皮細胞において活性酸素誘導やNFκB経路，MAPキナーゼ経路，Notch経路，Wnt-βcatenin経路，VHL-HIF1 系およびKeap1-Nrf2 系の活性化が惹起され，増殖因子・サイトカインや細胞接着因子の産生を介した炎症性細胞浸潤や線維芽細胞誘導を惹起して間質線維化を進行させる可能性が示されている^{7,8)}．特に線維化促進性の増殖因子であるtransforming growth factor-β1（TGF-β1）は中心的な役割を果たしており，I型受容体に結合するとactivin-linked kinase 5（ALK5）によりsmad2/3が活性化され，直接的に，またmiR192 発現誘導を介して間接的に，線維化関連遺伝子発現を促進する⁹⁾（図 1）．腎線維化の最終的なエフェクター細胞である線維芽細胞はもともと局在する，もしくは浸潤してきた前駆細胞が分化・増殖したもの他，毛細血管周囲細胞，内皮細胞や尿細管上皮細胞が形質転換して派生したものからなっており，様々な形質を有する細胞集団と考えられる¹⁰⁾．現時点で全ての線維芽細胞を捉え得るマーカーはなく，目的に応じて注目する形質に特異的なマーカーを選択している¹¹⁾．一般にmyofibroblastのマーカーと称して

図2. マウス腎線維化病巣における線維芽細胞マーカーとI型 $\alpha 1$ プロコラーゲンmRNAの局在 (FITC/ローダミン赤 (左), アルカリフォスファターゼ (右), 400倍)

マウス抗糸球体基底膜抗体 (GBM) 腎炎モデルの腎組織を用いて, 抗 α 平滑筋アクチン抗体 (左: 緑) と抗fibroblast specific protein 1 (FSP1) 抗体 (左: 赤) を用いた二重蛍光抗体法, および同一切片上でマウスI型プロコラーゲン $\alpha 1$ 鎖のcRNAを用いたin situハイブリダイゼーション法 (右: 青) を行った. 間質線維化病巣においては, α 平滑筋アクチン陽性ではなく, FSP1陽性の間質細胞 (⇒) がI型コラーゲンを産生 (➡) していた.

汎用されている α 平滑筋アクチンは, その陽性細胞が腎線維化病巣において増加するものの, I型コラーゲン産生の中心的な細胞ではないことから (図2), 他の臓器線維化の場合とは異なる細胞集団である可能性があり, 注意を要する. さらに上述の細胞内情報伝達系のほとんどは, 尿細管上皮細胞のみならず, 線維芽細胞においても病態特異的に重要な役割を果たしていることが示されている. 遺伝子改変動物を用いた我々の検討では, 尿細管上皮細胞特異的にNF κ B経路を阻害すると, 抗糸球体基底膜抗体腎炎モデルマウスにおいて間質線維化が抑制された. 一方, 閉塞性腎症モデルマウスにおいては, 線維芽細胞特異的なNF κ B経路の阻害によって間質線維化が抑制され, 逆の組み合わせでは抑制効果は認められなかった¹²⁾ (図3). これらの結果より, 腎線維化抑制のためのアプローチには, 病態の相違や標的細胞を考慮した戦略が重要と考えられ

る.

3. 腎線維化の評価

現時点において腎線維化の程度を定量的に評価できる方法は腎生検のみであり, それに代わるバイオマーカーはない. 腎生検は侵襲的な検査であり, 継時的な変化を追うために繰り返して行うことは困難であり, また様々な禁忌が挙げられる. 特に進行した萎縮腎では, 原疾患に特徴的な組織所見が失われているために診断価値が低いことに加え, 大量出血するリスクが高く, 腎生検の禁忌とされている. 腎線維化の進行は腎萎縮のプロセスであることから, 腎生検による線維化の定量的評価は初期の段階でしか適応とならない. そこで非侵襲的で定量性の高い評価方法が必要とされてきた. 我々は, diffusion-weighted (DW) MRIを用いた非侵襲的な画像診

図 3. 細胞特異的な $lkb1N$ 遺伝子発現マウスを用いた腎線維化の抑制効果¹¹⁾
(マッソントリクローム染色, 200 倍)

A: 尿管上皮細胞特異的に $lkb1N$ 遺伝子を発現してNF κ B経路を抑制するマウスを用いて抗GBM抗体腎炎モデルを作成したところ, 野生型マウスの間質病変と比較して (i), 遺伝子改変マウスでは有意に間質線維化が軽減していた. (ii) (線維芽細胞特異的なNF κ B経路の抑制では, 抗GBM抗体腎炎の間質病変は有意な影響を受けなかった.)

B: 線維芽細胞特異的に $lkb1N$ 遺伝子を発現してNF κ B経路を抑制するマウスを用いて閉塞性腎症モデルを作成したところ, 野生型マウスの間質病変と比較して (i), 遺伝子改変マウスでは有意に間質線維化が軽減していた. (ii) (尿管上皮細胞特異的なNF κ B経路の抑制では, 閉塞性腎症の間質病変は有意な影響を受けなかった.)

断による腎線維化の定量的評価を検討してきた⁵⁾. 様々な原疾患によるCKD患者を対象とした検討結果では, DW-MRIによる腎皮質部分の計測値(ADC値)はGFRと正の相関を示し, また腎生検を施行できた症例ではADC値と腎線維化の程度との間に負の相関が認められた(図4). 現在, 静磁場強度3テスラの高解像度MRIを導入し, 症例数を増やしつつ経時的なADC値の変化と臨床パラメーターの変動を検討しており, 非侵襲的な腎線維化の定量的評価系を確立したいと考えている.

4. 腎線維化の治療

現時点において, 臨床導入された腎線維化に特化した治療法はない. 上述のように腎機能の低下とともに間質線維化が進行していくことから, 腎機能を温存し透析導入を回避させる治療は線維化の進行抑制に有効と考えられる. 疾患特異的な治療としては, 透析導入の三大原疾患である糖尿病性腎症, 慢性糸球体腎炎と腎硬化症において, それぞれ血糖コントロール, 副腎皮質ステロイド療法と降圧療法が挙げられる. また表に, 保存期CKDに対する一般的な治療法

図 4. CKD患者における腎生検の間質線維化の程度とDW-MRIのADC値との相関⁴⁾ (マッソントリクローム染色, 200倍)

腎生検を行ったCKD患者群において、腎生検組織における半定量的な間質線維化の程度(線維化指数)と腎生検前に行ったDW-MRI撮影における腎皮質ADC値との間には、有意な相関が認められた。

表. 保存期CKDに対する一般的治疗

1. 食事療法 (塩分制限, たんぱく質制限)
2. RA系阻害
3. 高血圧治療
4. 貧血治療
5. Ca, リン酸, ビタミンD管理
6. 尿酸管理 (アロプリノール)
7. 血糖・脂質管理 (スタチン, PPAR γ アゴニスト)
8. 代謝性アシドーシス治療 (重曹)
9. 生活指導 (禁煙, 運動, 体重適正化など)

を挙げる。これらのエビデンスレベルはそれぞれ異なるものの、CKDの進行抑制を目指して日常診療で行われている。このうち、renin-angiotensin系阻害薬を代表として、スタチン、造血刺激因子や重曹投与には、動物実験レベルでの抗腎線維化効果が報告されている^{13, 14)}。

現時点では研究レベルにあるが、近い将来には臨床導入が期待される抗腎線維化治療として

は、TGF- β 1作用の阻害効果を示すPirfenidoneとヒト化抗TGF- β 1抗体(Fresolimumab)において、動物実験における腎線維化抑制効果を踏まえた臨床試験が行われている^{15, 16)}。またTGF- β 1の線維化促進作用に拮抗して抑制効果を示すbone morphogenic protein 7とその受容体に特異的に結合するペプチドアゴニストに関しても、様々な疾患モデルにおいて抗腎線維化効果が示されている¹⁷⁾。腎細胞において炎症促進性に働くNF κ B経路に対抗し、抗酸化・炎症抑制性に働くKeap1-Nrf2系を活性化する薬物としてBardoxolone methyl(BDX)が注目されており、糖尿病を伴う保存期CKD患者を対象とした臨床試験が行われた。CKDステージG3bからG4を対象としたBEAM試験では、52週間の治療期間において用量依存性にeGFRの改善が認められた¹⁸⁾(図5)。また、投与を終了した後も観察を続けたところ、4週にわたって有意なeGFRの改善が継続し

プラセボ	57	56	55	53	54	54	54	53	53	52	53	51	53	52
Bardoxolone methyl, 25 mg	57	53	52	52	52	51	51	49	49	47	48	48	48	48
Bardoxolone methyl, 75 mg	57	55	51	51	53	52	52	51	48	50	50	48	48	48
Bardoxolone methyl, 150 mg	56	55	55	54	53	52	52	48	48	47	47	46	46	44

図 5. 糖尿病を合併したCKDステージG3b～G4 患者におけるBardoxolone methyl投与のeGFRに対する効果¹⁷⁾

52 週間のBardoxolone methyl投与期間中、用量依存性にeGFRの改善が認められた。

て認められ、BDXが腎組織変化（間質線維化など）を改善させた可能性が示唆される。心血管病による入院・死亡が有意に増加したために早期に終了となったBEACON試験においても、BDX群の腎機能は改善傾向が認められた¹⁹⁾。

今後の展望

腎線維化の改善に関しては、動物実験レベルでは可逆性を示唆するデータが報告されているものの、臨床の現場ではきわめて稀な現象であり、進行したCKD患者の腎機能を回復させる治療は見当たらない。しかし、糖尿病性腎症患者への腎臓移植によって糖尿病を完治させると糸球体硬化病変のみならず、萎縮尿細管や間質線維化まで改善することが報告されており²⁰⁾、CKD患者においても腎線維化が可逆的である可能性があり、治療薬開発の努力は継続されなければならない。今後、抗腎線維化薬の候補薬剤を用

いた臨床研究において、腎機能改善効果が間質線維化の改善を介しているのか否かを明らかにするためには、非侵襲的な定量的評価法が必須であり、我々が検討を進めているDW-MRIがその選択肢の一つになるものと期待している。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Wright JR, et al: Clinicopathological correlation in biopsy-proven atherosclerotic nephropathy: implications for renal functional outcome in atherosclerotic renovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 16: 765-770, 2001.
- 2) Souma T, et al: Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 24: 1599-1616, 2013.
- 3) Levey AS, et al: The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 80: 17-28, 2011.
- 4) Theilig F, et al: Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria. *Ann Anatomy* 192: 125-132, 2010.

- 5) Inoue T, et al : Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 22 : 1429–1434, 2011.
- 6) Mimura I, et al : The suffocating kidney : tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 6 : 667–678, 2010.
- 7) Chuang PY, et al : Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. *J Mol Med* 91 : 549–559, 2013.
- 8) Inoue T, et al : Targeted expression of a pan-caspase inhibitor in tubular epithelium attenuates interstitial inflammation and fibrogenesis in nephritic but not nephrotic mice. *Kidney Int* 82 : 980–989, 2012.
- 9) Meng XM, et al : Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci* 124 : 243–254, 2013.
- 10) LeBleu VS, et al : Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19 : 1047–1054, 2013.
- 11) 岡田浩一 : 間質細胞の細胞特性. *日腎会誌* 50 : 570–576, 2008.
- 12) Inoue T, et al : Fibroblast expression of an I κ B dominant-negative transgene attenuates renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21 : 2047–2052, 2010.
- 13) Turner JM, et al : Treatment of chronic kidney disease. *Kidney Int* 81 : 351–362, 2012.
- 14) Rosenbloom J, et al : Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochim Biophys Acta* 1832 : 1088–1103, 2013.
- 15) Cho ME, et al : Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2 : 906–913, 2007.
- 16) Trachtman H, et al : A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 79 : 1236–1243, 2011.
- 17) Sugimoto H, et al : Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med* 18 : 396–404, 2012.
- 18) Pergola PE, et al : Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 365 : 327–336, 2011.
- 19) de Zeeuw D, et al : Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med* 369 : 2492–2503, 2013.
- 20) Fioretto P, et al : Remodeling of renal interstitial and tubular lesions in pancreas transplant recipients. *Kidney Int* 69 : 907–912, 2006.