

CKDにおける新規バイオマーカー Ngalの意義

Clinical implication of a novel biomarker Ngal in CKD

森 潔 向山政志 桑原孝成
笠原正登 横井秀基 中尾一和

Abstract

We review diagnostic importance of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal or lipocalin 2) in acute kidney injury and chronic kidney disease, and discuss the impact of novel biomarker analysis upon progress of nephrology.

Key words: albuminuria, diabetic nephropathy, glomerular filtration, diagnosis, angiotensin receptor blocker

はじめに

ライフスタイルの変化すなわち脂肪分の多い食物の摂取や運動不足が一因となって、糖尿病やメタボリックシンドロームを有する患者が我が国で、あるいは世界中で増加している。新しい糖尿病や高血圧の治療薬はどんどん開発されているが、糖尿病性腎症から透析に至る患者は増加の一途を辿っており、末期腎不全の前段階としての慢性腎臓病(CKD)の病勢や治療効果を的確に判断できる指標が求められている。

本稿では、最近、急性腎不全の早期診断法として注目されている尿中 Ngal¹⁾に関して、CKDにおける位置づけの現況を述べたい。

1. Ngalの作用

neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)は好中球の分泌顆粒中の gelatinase B (MMP-9ともいわれる、IV型コラーゲンの分解酵素)と共有結合している未知のタンパクとして1993年に Kjeldsen らにより同定された²⁾。Yang らが2002年に Ngalによる腎分化誘導活性^{3,4)}、森らが2005年に腎保護活性⁵⁾を報告して

以来、腎障害に関与するタンパクとして急速に研究が進んできている。後述のように、Ngalは腎臓以外にも幅広い作用を有する⁶⁾。Ngalは種々の刺激によって発現誘導されるため^{1,6)}、様々な研究グループによって色々な呼称を与えられており、文献検索上、注意を要する。lipocalin 2 (LCN2), human neutrophil lipocalin (HNL), siderocalin, oncogene 24p3, neu-related lipocalin (NRL), $\alpha 2$ -microglobulin-related protein, 24 kDa superinducible protein (Sip24)などがその別称である。

2. 急性腎不全における Ngal の意義

2003年に Mishra らはマウスやラットの腎障害モデルにおいて腎臓および尿中で Ngal タンパクが増加することを報告した⁷⁾。これを受けて、2005年に森らはヒト急性腎不全の血液、尿、腎組織中に多量の Ngal タンパクの集積がみられることを明らかにした⁵⁾(図1)。更に腎不全患者において血清クレアチニン濃度と尿中 Ngal 濃度が高い相関を示すことから⁵⁾(図2)、尿中 Ngal が腎不全の新規バイオマーカーとなりうる可能性を提示した。2005年 Mishra らは

Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Takashige Kuwabara, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Kazuwa Nakao: Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine 京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科

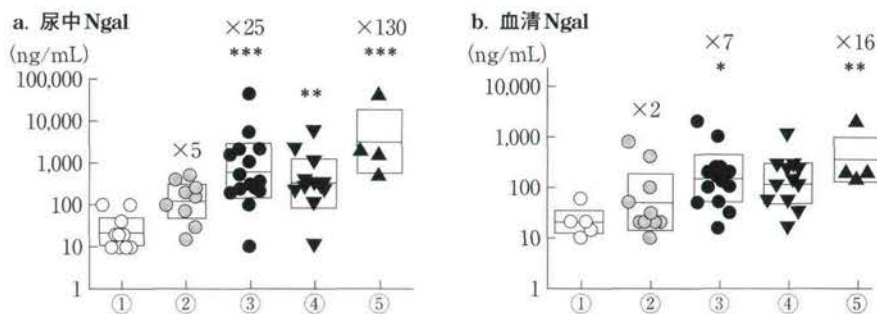


図1 腎不全患者における(a)尿中および(b)血清 Ngal 濃度(文献⁵⁾より引用)

① 健康人, ② 慢性腎不全, ③ 急性腎不全(④ 敗血症を伴わないもの, ⑤ 敗血症を伴うものに分けた場合). □は相乗平均(+/-SD).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 健康人. ×は健康人の相乗平均の何倍かを示す.

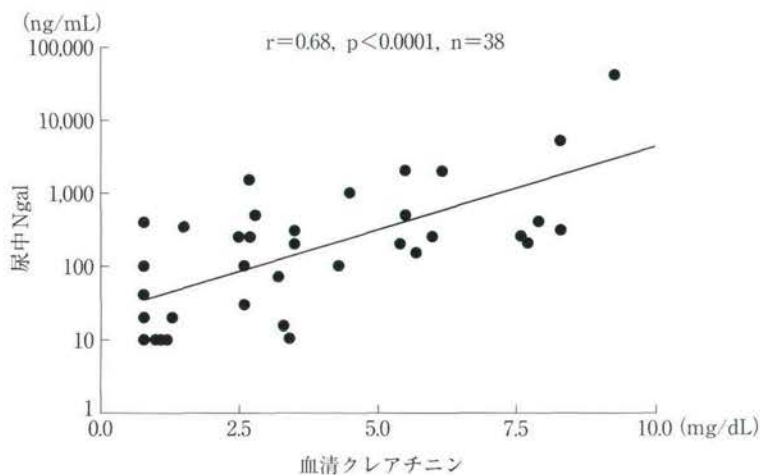


図2 腎不全における尿中 Ngal と血清クレアチニン濃度の相関(文献⁵⁾より改変)

開心術を受けた小児の術後の尿中・血中 Ngal 濃度の推移を検討し、手術2時間後に著しく尿中あるいは血中 Ngal の上昇した患児では1-3日後にはほぼ100%の確率で血清クレアチニン濃度が術前の1.5倍以上に到達し、その時点で急性腎不全と診断されるという驚くべき成績を発表し⁸⁾(図3)、急性腎不全の超早期診断法としての尿中 Ngal の有用性を世界に知らしめた。血中 Ngal は尿中 Ngal と同様に術後早期に増加したが、増加率は尿の方が血液よりも大きかった。Wagenerらは成人の開心術について同様の検討を行い、小児においてほどの感度、特異性はないものの、やはり尿中 Ngal 濃度の上昇によ

り術後腎不全を早期にある程度予測できることを確認した⁹⁾。Cocaらは2008年に急性腎不全バイオマーカーの非常に優れた systematic review を行い¹⁰⁾、良いバイオマーカーのもつべき特徴として急性腎不全の早期診断、確定診断、死亡率予測を可能にするとの3点をあげ、尿中 Ngal を早期診断に有用なマーカーの一つとして分類した。他のバイオマーカーとしては血清クレアチニン、シスタチンCならびに、尿中 interleukin-18(IL-18)、kidney injury molecule-1(KIM-1)、Nアセチルグルコサミニダーゼ(NAG)などが紹介された。Nickolasらは救急外来受診者全員の初診時の尿中 Ngal を測定し、尿中 Ngal は

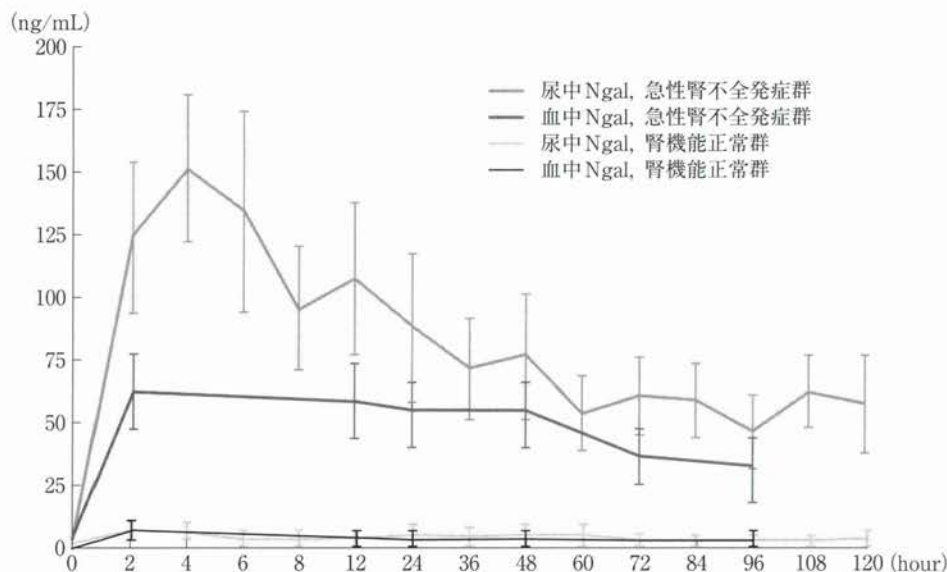


図3 小児71人の開心術後の尿中、血中Ngal濃度の推移(文献⁸⁾より改変)

術後腎機能正常群は50人。21人においては、手術24-72時間後に血清クレアチニン濃度が術前の1.5倍以上に増加し、その時点で急性腎不全と診断された。

急性腎不全と腎前性高窒素血症(脱水)・安定期CKDとの鑑別に有用であることを報告し¹¹⁾、開心術後急性腎不全以外の幅広い患者群において尿中Ngalにより急性腎不全を早期診断できることを明らかにした(図4)。

森らは術後腎不全において尿中Ngalは手術当日から減少に転じるのに対して血清クレアチニンは数日間上昇し続けることを理解するために、腎不全を山火事に例えて考察した¹⁾。山火事の強さを評価するためには、山火事(腎障害)を免れて残存している元気な樹木の割合(残存腎機能)および現在活発な炎の量(腎障害の勢い)という2つの指標が大切であろうとして、‘腎不全の山火事理論’を提唱した(図5)。それで、血清クレアチニンや糸球体濾過量は前者の指標であるのに対して、尿中Ngalは後者の判定に有用かもしれないと述べ、既に他施設からの論文でも引用されている¹²⁾。種々の細胞においてNgalの発現がIL-1 β などの炎症性サイトカインによって転写因子NF κ B依存性に速やかに誘導されること¹³⁾は、それを支持する知見と考えられる。厳密には、以下に述べるように、比較的安定しているCKDにおいても尿中Ngal

はある程度高値となるため(恐らく再吸収不全や腎局所での産生により)、尿中Ngalは残存腎機能の影響も受けると考えるべきであろう。

3. CKDにおけるNgalの意義

尿中Ngalが急性腎不全の診断に有用なのであれば、CKDの評価においても役に立つ可能性が考えられる。DingらはIgA腎症の症例において腎生検所見と尿中Ngal濃度を比較し、糸球体内でメサンギウム細胞の増殖が顕著であるほど、また尿細管間質障害が強いほど、尿中Ngal濃度も高くなることを示した¹⁴⁾(図6)。栗原らは、腎疾患の治療に伴ってどのように尿中Ngalが変化するか、また尿中Ngalがどの組織に由来するかについて検討した¹⁵⁾。まずマウス糖尿病性腎症のモデルについて検討し、腎臓での産生ではなく主に再吸収の不全によって尿中Ngalが著しく増加することを明らかにした(図7)。またアンジオテンシン受容体阻害薬の投与により尿中Ngalは著減した。ヒトにおいても同様の成績を得ている(投稿中)。次にネフローゼ症候群の症例について検討し、腎組織中のNgalの少なくとも一部は血液に由来し、アル

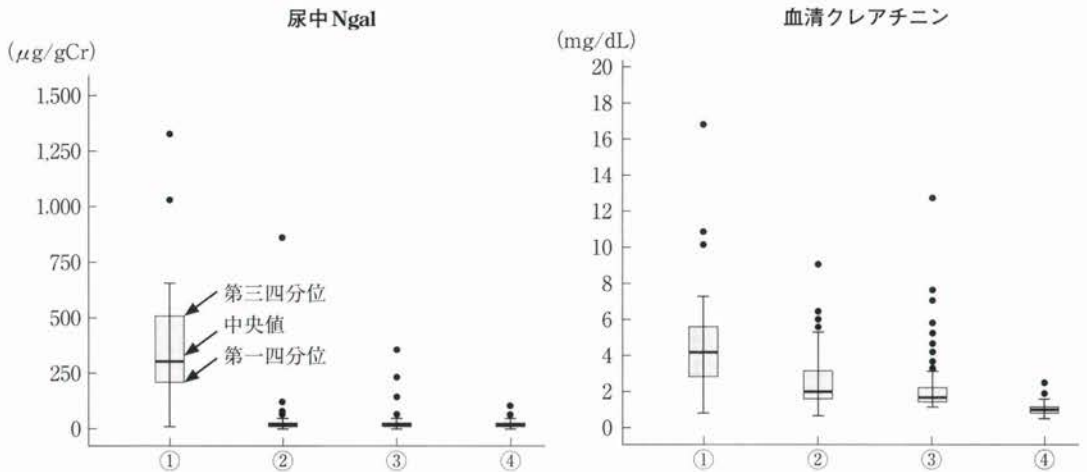


図4 救急外来受診者の尿中 Ngal および血清クレアチニン濃度(文献^[1]より引用)

①急性腎不全, ②腎前性高窒素血症(脱水), ③安定期 CKD, ④健康人.

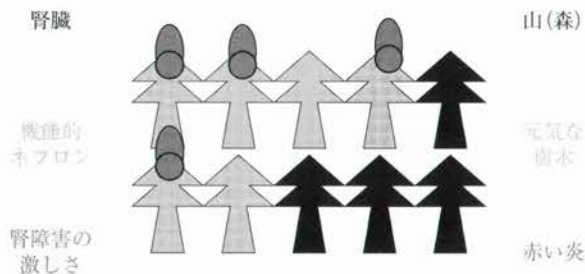


図5 腎不全の山火事理論(Forest Fire Theory)(文献^[1]より引用)

腎臓が多数のネフロンから構成されているように、山(森)には多くの樹木がある。腎不全の強さを評価するためには、障害(⬆で示す樹木の焼失)を免れて残存する機能的ネフロン(⬆で示す元気な樹木)の割合のみならず、今現在の障害の激しさ(●の炎の量)を知ることが重要である。尿中 Ngal は後者の評価に有用かもしれない。

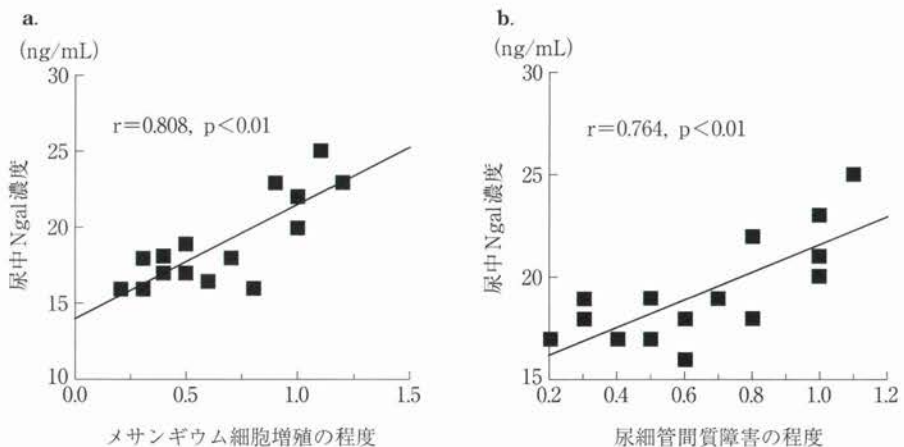
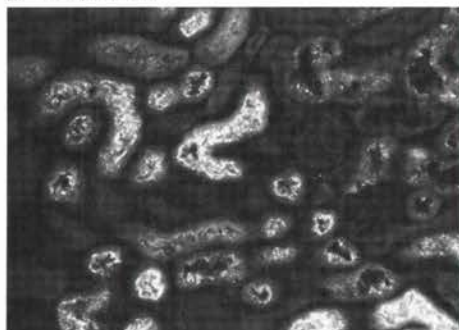


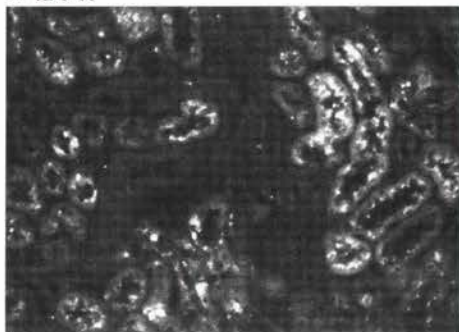
図6 IgA腎症の腎組織像と尿中 Ngal 濃度の相関(文献^[14]より引用)

(a)メサンギウム細胞増殖および(b)尿細管間質障害の程度が評価された。

a. コントロール



b. 糖尿病



c. 尿中 Ngal/Cr ($\mu\text{g/gCr}$)

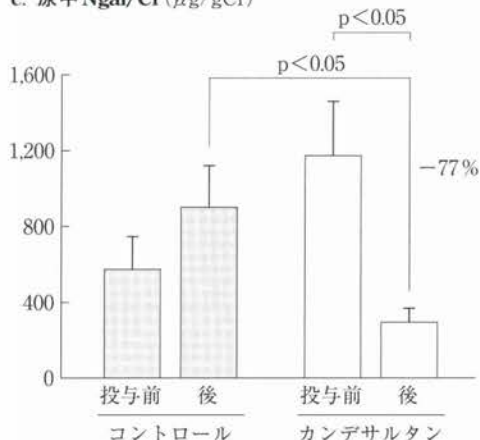


図7 糖尿病マウスにおける Ngal の再吸収および尿中排泄 (文献¹⁵⁾より引用)

- 蛍光標識 Ngal を (a) 非糖尿病コントロールマウスに腹腔内投与すると糸球体濾過され、近位尿細管にて盛んに再吸収された。
 (b) 糖尿病マウスでは再吸収が半減していた。
 (c) 糖尿病マウスにカンデサルタンを1週間投与すると尿中 Ngal 排泄が著しく減少した。

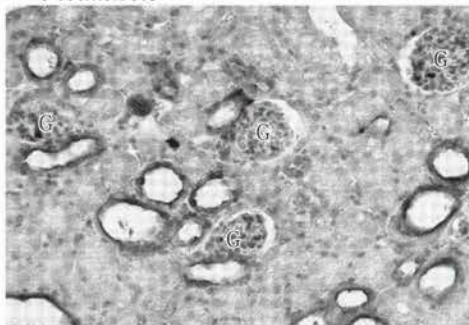
ブミンの再吸収顆粒と共局在することを示した。更にステロイドや免疫抑制剤による治療により尿中 Ngal は2-4週間で著しく減少した。また一側尿管結紮による水腎症モデルを用いて、患側腎では遠位ネフロン(Henle 上行脚)で Ngal の発現が誘導されるのに対して、健側腎では血液由来 Ngal が近位尿細管の管腔側から盛んに再吸収されることを明らかにし(図8)、実際のヒト腎疾患においては、腎での再吸収と産生の両者が、尿中 Ngal の調節に密接に関与しているであろうと結論づけた。また、Ngal はアルブミンと同様に、近位尿細管に発現する megalin によって再吸収されるので¹⁶⁾、ネフローゼでは、近位尿細管の管腔側に運ばれた過剰のアルブミンによって、Ngal 再吸収の競合阻害や尿細管細胞へのストレスが起これ、Ngal の再吸収が減少し尿中排泄が増加するであろうと考えた¹⁵⁾。

Damman らは心不全患者において、健常人と比べて有意に血中のクレアチニン・(心不全のマーカーである)NT-proBNP 濃度が高値、尿中のアルブミン・Ngal 排泄も高値で、血中 NT-proBNP 濃度と尿中 Ngal 濃度に正の相関を認めたと報告している¹⁷⁾。腎機能悪化やアルブミン排泄亢進のほかに、尿中 Ngal の増加に対して NT-proBNP 上昇が独立した規定因子となるかどうかについては今後の課題である。2009年に Bolignano らは CKD 患者において、尿中、血中 Ngal 濃度が高い症例では明らかに腎予後が不良であることを報告した¹²⁾(図9)。

4. Ngal の多彩な鉄依存性作用

Ngal は脂溶性リガンドのキャリアタンパク群であるリポカリンスーパーファミリーに属する¹⁸⁾。Goetz らは、ヒト Ngal タンパクを大腸菌

a. 尿管結紮側腎



b. 健常側腎

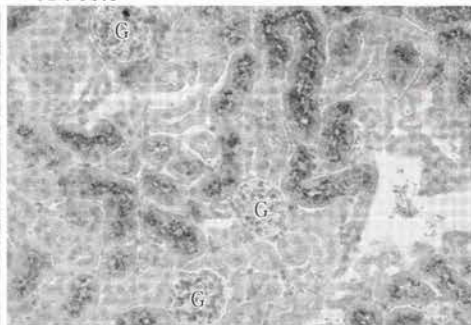
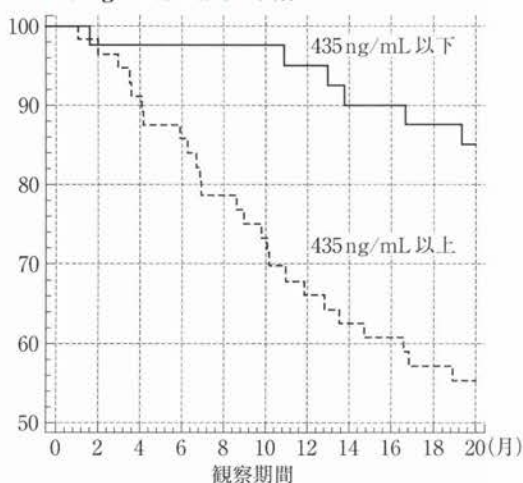


図8 マウス側尿管結紮 24 時間後の腎内 Ngal タンパクの局在
(文献¹⁵⁾より引用)

a: 患側(結紮側), b: 健常側(反対側).

G: 糸球体.

a. 血中 Ngal と腎生存率の関係



b. 尿中 Ngal と腎生存率の関係

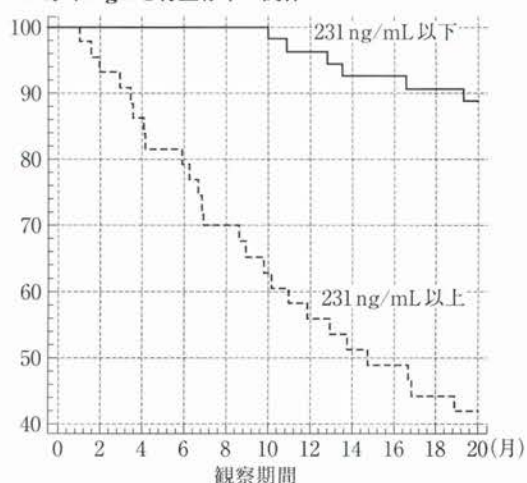


図9 血中および尿中 Ngal 濃度と腎生存率(%)の関係(文献¹²⁾より引用)

血清クレアチニン濃度の倍加あるいは透析導入を腎死のエンドポイントとして(a)血中および(b)尿中 Ngal のカットオフ濃度との関係を示す。

に発現させて X 線結晶構造解析を行い、ヒト Ngal タンパクは siderophore と呼ばれる大腸菌由来の化合物を介して 3 価の鉄イオンと結合することを明らかにした¹⁹⁾。Ngal : siderophore : Fe^{3+} 複合体は鉄供与体として作用するのに対して、Ngal タンパク単体(apo-Ngal)や Ngal : siderophore 複合体は鉄キレート体として働く^{1,20,21)}。Goetz ら、Flo ら、あるいは他のグループは試験管内でまた個体レベルで Ngal は鉄キレート体として、大腸菌や結核菌の増殖を強力

に阻止することを証明した²²⁻²⁵⁾。一方で、腎臓の分化促進^{3,4)}や腎保護⁵⁾の作用、あるいは花井らの示した癌の再上皮化作用(mesenchymal-epithelial transition)²⁶⁾は鉄供与体としての作用と考えられる。このほかに Ngal は鉄キレートにより、リンパ球、神経マイクログリア、赤芽球などのアポトーシスを惹起することも報告されている²⁷⁻³⁰⁾。

5. 理想の腎障害バイオマーカーとは

以上のようなNgalの発現調節や代謝動態の情報を総合することにより、理想の腎障害バイオマーカー像として8つの項目をあげることができる³¹⁾。①腎障害の早期に鋭敏に増加する(Ngalについての該当の程度は◎)。②腎障害に特異的で他の疾患では増加しない(Ngalは細菌感染や炎症でも増加するので×)。③腎臓内での再吸収の有無や発現部位が明確である(○)。④増加は一過性であり、経過観察に有用である(○)。⑤他の分子との結合の有無が解析されている(Ngalとgelatinase Bとの結合がマウスやラットでみられるのかまだ確定的ではないので×)。⑥分解されにくい(Ngalは酸性条件に強いので○)。⑦測定法が簡便である(Ngal ELISAキットが市販されているので○)。⑧下部尿路から分泌されたり、膀胱炎の影響を受けたりはしない(尿路感染の影響を受けるかもしれないので×)。尿中Ngalはこのうち5項目を満たし、最善ではないにしても非常に優秀なマーカーと思われる。尿中Ngalの増加が腎疾患特異的ではないことを述べると、あたかもNgalだけが特に有用性の低いバイオマーカーにみえるかもしれないが、実際には他の多くのマーカーについても腎臓以外での産生や腎障害以外での増加がみられるはずなのに、その点を完全に無視して解析、報告されているケースが非常に多い。むしろ、多くの疾患の合併がありうる患者群においても、尿中Ngalによって急性腎不全の早期予測が可能であったことが、繰り返し繰り返し、多くの施設から報告されている¹⁰⁾。

6. 新規バイオマーカーから学ぶこと

Ngalの動態を詳細に解析することから、‘腎不全の山火事理論’¹⁾や‘理想の腎障害バイオマーカー像’³¹⁾を導くことができる。また上述のように栗原らは糖尿病性腎症マウスの近位尿細管においてNgalの再吸収効率が約50%に低下していることを明らかにしたが¹⁵⁾、実は既に糖尿病性腎症ラットにおいてアルブミンの再吸収効率がやはり半減していて、これがACE阻害

薬やアンジオテンシン受容体阻害薬の投与により見事に回復することは2003年に藤乗らにより報告されている³²⁾。(ただし、糖尿病状態では糸球体で濾過されるアルブミンの量が増えていて、近位尿細管での総アルブミン再吸収量は代償性に軽度上昇している可能性もある。しかし、これを正確に測定することは技術的に非常に難しい。外から一定量のラベルタンパクを投与しても、そのタンパクの再吸収の割合しか検討できない。このあたりの議論は別の機会に詳しく述べたい。)

CKDにおいてタンパク尿・アルブミン尿の存在は、糸球体濾過量の低下とともに、腎機能悪化の独立した危険因子であり、CKDの診断基準ともなっている腎臓病学の根幹をなす兆候である³³⁾。常識的には健常人では尿タンパク陰性あるいはアルブミン尿30mg/day以下と考えられているが、Osickaらは放射線標識したアルブミンをヒトに注射することにより、アルブミンの再吸収と分解、排泄の問題を追求し、健常人の尿中に(アルブミンとしては検出されないサイズの)アルブミン断片が1.0–1.5g/day程度も排泄されていて、糖尿病では分解を受けていないアルブミンの排泄割合が増加するとのデータを発表した³⁴⁾。またRussoらは蛍光標識アルブミンとintravital two-photon顕微鏡の手法を用いて、正常ラットにおいて、これまでの通説の50倍量(ヒトに換算すると150–300g/day)のアルブミンが糸球体において濾過され、近位尿細管の高速回収経路によって再吸収されるとのデータを報告し³⁵⁾、大論争を巻き起こしている^{36,37)}。以上のように、尿中Ngalの由来や調節機序を厳密に解析すると、近位尿細管での再吸収の重要性がよく理解され、アルブミンを含めた尿中バイオマーカー全般に対するとらえ方が変わり、腎臓病学の本質にかかわる多くの疑問点が浮き彫りにされてくる。著者らはこのような研究の進め方をbiomarkerology(バイオマーカー学)と呼ぶことを提案したい。

おわりに

尿中Ngalは急性腎不全の早期診断に極めて

有用な新規バイオマーカーである。CKD においては尿中 Ngal は血清クレアチニン、タンパク尿、腎組織障害の程度、腎予後などと相関を示し、ステロイドやアンジオテンシン受容体阻害薬の投与により数週間で低下するため、CKD

の病勢や治療効果の判定に役に立つかもしれない。CKD において、尿中 Ngal が血清クレアチニンやタンパク尿とは独立した、真に有用な臨床パラメーターとなるかどうかは、今後一層の研究によって明らかとなっていくであろう。

■ 文 献

- 1) Mori K, Nakao K: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* **71**: 967-970, 2007.
- 2) Kjeldsen L, et al: Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* **268**: 10425-10432, 1993.
- 3) Yang J, et al: An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* **10**: 1045-1056, 2002.
- 4) Mori K, et al: Ureteric bud controls multiple steps in the conversion of mesenchyme to epithelia. *Semin Cell Dev Biol* **14**: 209-216, 2003.
- 5) Mori K, et al: Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **115**: 610-621, 2005.
- 6) 森 潔ほか: 多彩な生命現象に関わる鉄結合性小化合物 siderophore の意義. *細胞工学* **27**: 226-230, 2008.
- 7) Mishra J, et al: Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**: 2534-2543, 2003.
- 8) Mishra J, et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**: 1231-1238, 2005.
- 9) Wagener G, et al: Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* **105**: 485-491, 2006.
- 10) Coca SG, et al: Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int* **73**: 1008-1016, 2008.
- 11) Nickolas TL, et al: Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* **148**: 810-819, 2008.
- 12) Bolignano D, et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**: 337-344, 2009.
- 13) Cowland JB, et al: IL-1 β -specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol* **176**: 5559-5566, 2006.
- 14) Ding H, et al: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* **123**: 227-234, 2007.
- 15) Kuwabara T, et al: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int* **75**: 285-294, 2009.
- 16) Hvidberg V, et al: The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* **579**: 773-777, 2005.
- 17) Damman K, et al: Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), a marker of tubular damage, is increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **10**: 997-1000, 2008.
- 18) Flower DR, et al: The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* **1482**: 9-24, 2000.
- 19) Goetz DH, et al: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**: 1033-1043, 2002.
- 20) Li JY, et al: Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**:

- C1547-1559, 2004.
- 21) Barasch J, Mori K: Cell biology: iron thievery. *Nature* **432**: 811-813, 2004.
 - 22) Flo TH, et al: Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**: 917-921, 2004.
 - 23) Berger T, et al: Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1834-1839, 2006.
 - 24) Martineau AR, et al: Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* **117**: 1988-1994, 2007.
 - 25) Saiga H, et al: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol* **181**: 8521-8527, 2008.
 - 26) Hanai J, et al: Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells. *J Biol Chem* **280**: 13641-13647, 2005.
 - 27) Devireddy LR, et al: Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* **293**: 829-834, 2001.
 - 28) Devireddy LR, et al: A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* **123**: 1293-1305, 2005.
 - 29) Lee S, et al: A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia. *J Immunol* **179**: 3231-3241, 2007.
 - 30) Miharada K, et al: Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol* **215**: 526-537, 2008.
 - 31) 森 潔ほか: 尿中 Ngal 濃度の解析から考えられる理想の腎障害マーカー像(Kidney Biomarkerology 2008). *日腎会誌* **50**: 228, 2008.
 - 32) Tojo A, et al: Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertens Res* **26**: 413-419, 2003.
 - 33) 日本腎臓学会(編): CKD 診療ガイド, 東京医学社, 2007.
 - 34) Osicka TM, et al: Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes* **49**: 1579-1584, 2000.
 - 35) Russo LM, et al: The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* **71**: 504-513, 2007.
 - 36) Christensen EI, et al: Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts! *Kidney Int* **72**: 1192-1194, 2007.
 - 37) Jarad G, Miner JH: Albuminuria, wherefore art thou? *J Am Soc Nephrol* **20**: 455-457, 2009.