尿毒症物質により誘発される心腎連関を介した酸化ストレス臓器障害の分子機構

渡邊 博志

Molecular Mechanisms for Uremic Toxin-induced Oxidative Tissue Damage via a Cardiovascular-Renal Connection

Hiroschi Watanabe

*Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Kumamoto University;
5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.*

(Received May 26, 2013)

Chronic kidney disease (CKD), marked by a progressive loss in renal function, is a leading cause of hemodialysis initiation and cardiovascular disease (CVD). There are currently 13.3 million patients with CKD and 300 thousand patients are currently undergoing hemodialysis in Japan. Therefore, preventing the initiation of dialysis and reducing the risk of cardiovascular death are high-priority issues from the viewpoint of public health and economic implications. Understanding the molecular mechanism responsible for the progression of CKD and cardiovascular damage regarding crosstalk between the kidney and cardiovascular system is an important issue in controlling the pathogenesis of CKD-CVD. However, the mechanisms involved in CKD-CVD are not well understood. This hinders the development of new treatment strategies. We have been investigating the role of protein bound uremic toxins, that are difficult to remove by hemodialysis, on the onset and progression of CKD and CVD. The relationship between their redox properties and the pathogenesis of CKD-CVD was examined. In this review, we focus on two sulfate conjugated uremic toxins, namely, indoxyl sulfate (IS) and *p*-cresyl sulfate (PCS), and summarize recent studies that provide new insights on the molecular mechanisms responsible for uremic toxin-induced oxidative tissue damage via a cardiovascular-renal connection.

Key words——chronic kidney disease; indoxyl sulfate; oxidative stress; *p*-cresyl sulfate; reactive oxygen species; uremic toxin

1. はじめに

慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) は、腎障害や腎機能低下が慢性的に続く状態であり、血液透析導入並びに心血管疾患 (cardiovascular disease; CVD) 発症の重大な危険因子である。現在、日本には約 1330 万人の CKD 患者がいると言われており、これは、成人の約 8 人に 1 人にあたる数である。また、末期 CKD である透析患者も 30 万人を超え、その数は毎年 1 万人ずつ増え続けると予想されている。加えて、透析患者の年間医療費の総額は 1 兆 5 千億円を超えていることから、CKD の制御による透析導入や心血管死の抑制は、保健衛生はもとよりのこと医療経済的にも最重要課題の 1 つと

されている。特に、CKD 患者の主たる死因が CVD であることから、腎機能低下と心血管障害あるいは両臓器間のクロストークに関する分子機序の解明は CKD-CVD (心腎連関) の病態制御において重要なカギを握る。しかしながら、CKD 及び CKD-CVD に関する病態進展の分子機構、特に最近新たな危険因子として注目されるようになってきた酸化ストレスや炎症の誘発機序については十分に明らかにされておらず、これが新規治療法開発のボトルネックとなっている。

CKD の中でも腎不全あるいは透析期まで進行すると、全身的な代謝の変化及び尿中への代謝産物の排泄障害に伴い、様々な尿毒症物質が体内に蓄積する。これまでに約 90 種類の尿毒症物質が報告されており、それらは 1) 水溶性低分子 (フェニル酢酸、ネオプテリン、グアニジノコハク酸及び尿酸等)、2) 中分子 (β_2 -ミクログロブリン、PTH、FGF23 及びシスタチン C 等)、並びに 3) 血清タンパク質

The author declares no conflict of interest.

熊本大学薬学部薬剤学分野 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

e-mail: hnabe@kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

結合性低分子（インドキシル硫酸（indoxyl sulfate; IS）、*p*-クレジル硫酸（*p*-cresyl sulfate; PCS）、フランジカルボン酸、馬尿酸及びキヌレニン酸等）の3つのグループに大別される。¹⁾ このうち、透析患者の血清中濃度が腎機能正常者に比べて10倍以上増加する尿毒症物質を Table 1¹⁾ に示す。

なかでも、血清タンパク質結合性低分子尿毒症物質は、血清中に豊富に存在するアルブミンと強固に結合することから、血液透析による体外への除去は非常に難しく、透析後においても依然として高い血清中濃度を示す。最近、ヨーロッパとアジアのCKD患者を対象とした臨床試験より、血清中IS及びPCS濃度の上昇が、1) CKDの進展（腎予後の低下）、2) CVD発症に伴う死亡率の増加、並びに3) 総死因死亡率の増加と有意に相関することが次々と報告された。²⁻⁴⁾ そのため、これらISやPCSといった尿毒症物質が腎予後に加え、透析患者のCVD発症リスクや長期予後の新規予測因子として注目されるようになってきた。このように、病態の予後予測因子としてこれら尿毒症物質の位置付けは

確立されつつあるが、一方で病態進展因子としての役割については不明な点が多かった。

このような背景の下、本総説ではCKD-CVDに係わる尿毒症物質として、ISとPCS（Fig. 1）をとり上げ、それらの生体内レドックス特性と酸化ストレスに関連した臓器障害の分子機構について、私達が得た最近の成果も含めて紹介する。

2. ISとCKD-CVD並びにミネラル代謝異常

ISは食事中的アミノ酸の中でもトリプトファンを原料とし、腸内細菌によってインドールへ変換された後、肝臓で水酸化酵素 cytochrome P450 2E1 と硫酸転移酵素 SULT により代謝を受けて生合成される硫酸抱合体である。血清中ではその95%以上がアルブミンと結合した状態で存在しており、代謝を受けることなく腎臓の近位尿細管の基底膜側に局在する有機アニオントランスポーター（organic anion transporter; OAT）を介した能動輸送により尿細管上皮細胞に取り込まれた後に尿中へと排泄される。⁵⁻⁹⁾ そのため、CKD患者においては腎臓での効率的な排泄が行えず、その血清中濃度は、健常人では $<2.5 \mu\text{M}$ 程度であるのに比べて、CKD患者においては、 $\sim 200 \mu\text{M}$ 程度まで上昇することが言われている。¹⁾

ISによる腎毒性に関しては、1990年頃から多くの報告がなされてきた。具体的には、5/6腎臓摘出ラットにISを経口負荷することで、腎線維化に関与するTGF- β 1、TIMP-1及びpro- α 1(I) collagenが上昇すること¹⁰⁾や抗酸化酵素であるSOD活性が低下する。¹¹⁾ さらに、ヒト近位尿細管由来上皮細胞（HK-2）において、IS添加により産生した活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）がNF- κ Bのシグナリングを活性化することやPAI-1の発現量を上昇させることが報告されており、その作用にはOATを介したISの細胞内移行が重要である。¹²⁾ こ

Table 1. Comparison of the Average Uremic Concentration with Normal Concentrations¹⁾

Molecules	Solute classification	Uremic concentration/ Normal concentration
Phenylacetic acid	Low molecular weight molecule	334.0
Neopterin	Low molecular weight molecule	60.3
Guanidino succinic acid	Low molecular weight molecule	47.7
Indoxyl sulfate	Protein-bound solute	43.2
Kynurenic acid	Protein-bound solute	27.6
Hippuric acid	Protein-bound solute	23.8
<i>p</i> -Cresyl sulfate	Protein-bound solute	21.9
Methylguanidine	Low molecular weight molecule	19.1
β_2 -Microglobulin	Middle molecule	15.9
Carboxymethyllysine	Protein-bound solute	15.4
IL-8	Middle molecule	12.3
PTH	Middle molecule	11.2
Osteocalcin	Middle molecule	10.5

Representative molecules, which uremic concentrations were more than 10 times higher than normal, are shown.

Fig. 1. Chemical Structures of Indoxyl Sulfate (IS) and *p*-Cresyl Sulfate (PCS)

のように、IS により誘導された ROS は、腎線維化に関与する TGF- β 1 を始めとする各種サイトカイン発現を上昇させるとともに、尿細管細胞の上皮間葉形質転換 (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) を誘発して腎線維化を促進する。¹³⁾ また、IS は尿細管における酸素代謝調節異常を惹起し、エリスロポエチン産生を低下させる。¹⁴⁾

実際には OAT は腎臓だけでなく、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞並びに骨芽細胞にもその発現が認められていることから (Fig. 2), IS が心血管系やミネラル/骨代謝系にも悪影響を及ぼすことは容易に予想できる。CVD の発症とその進展においては、心筋肥大、血管内皮障害、血管平滑筋の肥大や増殖、そして血管の石灰化が大きな要因として考えられているが、過去に IS は上記すべてのイベントに深く関与することが報告されている。具体的には、IS は血管内皮細胞に対しては、ROS の主要産生酵素である NADPH oxidase の活性化を介して ROS 産生を誘導し、MCP-1 発現量を上昇させ、最終的には細胞障害を惹起する。¹⁵⁾ 加えて、血管平滑筋細胞においても、IS は NADPH oxidase の活性化により、血小板由来増殖因子である PDGF- β を介して細胞増殖を促すこと、^{16,17)} また、IS によって産生した ROS が平滑筋の骨芽細胞への形質転換を促進することで血管の石灰化を惹起することが報告されている。¹⁸⁾ さらに、これらの作用は IS の投与により増強されること、加えて IS の前駆体 (インドール) の吸着薬で、IS の生体内蓄積を阻止するクレメジン®投与により軽減されることから、IS による効果であることが裏付けられている。

近年、骨代謝に及ぼす IS の影響についても検討

Fig. 2. OAT-mediated Cellular Transport of IS and PCS

されている。すなわち、Nii-Kono らは、マウスカルバリヤより採取した骨芽細胞において、細胞内に取り込まれた IS が ROS 産生を誘導し、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone; PTH) 受容体の発現を抑制することで、PTH の骨に対する反応性を低下させることを明らかにした。¹⁹⁾ また、Iwasaki らは、IS が CKD 時における骨代謝回転の低下に寄与することを報告している。²⁰⁾ さらに IS 由来の ROS は、DNA のメチル化を惹起し、ミネラル代謝調節分子である Klotho 発現を低下させる。²¹⁾

以上のように、腎近位尿細管、血管内皮、血管平滑筋並びに骨芽細胞に対する IS の作用は、OAT を介して細胞内に取り込まれた IS による、主に NADPH oxidase を介した ROS 産生が引き金となっている (Fig. 3)。

一方、私達は、健常者血清中で観察される低濃度の IS は、抗酸化効果を有するという興味深い知見を見い出した。すなわち、ヒト臍帯血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) に IS を添加したところ、CKD 患者の血清中で観察される高濃度域 ($>100 \mu\text{M}$) の IS は細胞内 ROS 量

Fig. 3. OAT-mediated Transport of IS Induces Renal, Vascular and Bone Toxicity

を増大させた。対照的に、健常者で観察される低濃度域 ($<10 \mu\text{M}$) の IS は、細胞内 ROS 量を有意に減少させた。次に、活性化好中球由来の ROS に及ぼす IS の影響を評価した結果、低濃度域の IS はスカベンジ作用を示した。低濃度域の IS による ROS 産生抑制効果について検証するため、無細胞系である xanthine/xanthine oxidase 系由来のスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) と H_2O_2 /UV 照射系由来のヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) に対する IS のスカベンジ作用について ESR 法により検討した。その結果、IS は濃度依存的に $\text{O}_2^{\cdot-}$ と $\cdot\text{OH}$ の産生を抑制したことから、IS 自身がラジカル消去能を有することが判明した (Fig. 4)。以上の結果より、CKD 患者では pro-oxidant として機能する IS が、健常者血清中で観察される低濃度域では、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ や $\cdot\text{OH}$ に対し

て anti-oxidant 作用を発揮するという二面的なレドックス特性を初めて見い出した。²²⁾ すなわち、IS は健常時又は CKD 発症初期においては、anti-oxidant として病態抑制的に機能しているのかもしれない。

3. PCS の腎近位尿細管への取り込みと NADPH oxidase を介した尿細管障害の分子機構

食物中のチロシンやフェニルアラニンに由来し、腸内細菌によって産生される *p*-クレゾールは、従来から積極的に研究が行われてきた尿毒症物質の 1 つであった。一方、2005 年に *p*-クレゾールの大部分は消化管吸収される際に腸管粘膜に存在する硫酸転移酵素により硫酸抱合を受け、循環血中においては、硫酸抱合体の PCS として存在していることが明らかとなった。²³⁾ しかしながら、IS とは異なりその動態特性並びに尿毒素としての作用については不明のままであった。

PCS は IS と同じくその構造内に硫酸基を有していることから、IS と類似した体内動態特性や生理作用を示す可能性が推察された。まず私達は、PCS のアルブミンに対する結合特性について限外濾過法及び蛍光プローブ法により検討した。その結果、IS と同様、PCS は血清中で主にアルブミン分子上のサイト II へ特異的に結合することが判明した (Fig. 5)。その際、結合定数は PCS 及び IS とともに 10^5 M^{-1} オーダーであり、同程度の結合親和性を有していた。²⁴⁾ 次に、私達は、PCS の腎排泄特性に関して、尿細管上皮細胞への PCS の取り込み機序を明らかにするために、ラット腎皮質スライス法を用いて PCS の取り込み実験を行った。その結果、PCS の取り込みが能動的であること ($K_m = 230 \mu\text{M}$)、またその取り込みは OAT 阻害剤と IS によって顕著に抑制された。このことから、PCS は、IS と同様に OAT の基質となることが強く示唆された。²⁵⁾ すなわち、PCS の腎排泄には OAT を介した尿細管上皮細胞への取り込みが大きく寄与していると考えられた。

上述したように血清中 PCS 濃度は、腎予後の予測因子となることが報告されたことから、私達は次に、PCS が腎障害の進展因子として作用するという仮説を立て検証することにした。まず、HK-2 を用いて PCS のレドックス特性について検討した結果、PCS は PKC 及び PI3K 経路を介した NADPH

Fig. 4. Scavenging Activity of IS against (A) $\text{O}_2^{\cdot-}$ Generated by Xanthine/Xanthine Oxidase System, and (B) $\cdot\text{OH}$ Generated by a H_2O_2 /UV System

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as compared with control.

Fig. 5. Uremic Toxins Binding Sites on Human Serum Albumin

CMPF, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; HA, hippuric acid; IA, indoleacetic acid.

oxidase の活性化により細胞内 ROS 産生を増大させた。その際、NADPH oxidase のサブユニットである Nox4 及び p22^{phox} のタンパク質発現が増大していた。また、PCS は線維化に関連する TGF- β 1, TIMP-1 及び Pro- α 1 (I) collagen の mRNA 及び active TGF- β 1 のタンパク質発現を増大させた。これらの作用は、OAT の阻害剤である probenecid 及び Nox4 と p22^{phox} の siRNA により抑制されことから (Fig. 6), PCS による ROS 産生並びに腎線維化には PCS の OAT を介した細胞内蓄積とそれに伴う NADPH oxidase 活性化が大きく寄与していることが判明した (Fig. 7)。次に、本細胞実験から得られた結果を *in vivo* で検証するため、PCS を負荷した CKD ラットでの検討を行った。本ラットでは、血清中 PCS 濃度の上昇に伴い、腎尿細管変性と線維化の亢進が観察された。その際、HK-2 で観察された腎臓における Nox4 と p22^{phox} の発現上昇及び NADPH oxidase 活性化に加え、TGF- β 1 の産生亢進と腎線維化が認められた。以上の結果から、CKD 状態で尿細管細胞内に蓄積した PCS は NADPH oxidase の活性化を介して ROS 産生を誘導し、active TGF- β 1 等の線維化関連因子の産生を亢進する結果、尿細管変性や腎線維化を惹起し、腎障害の進展因子となることが明らかとなった。²⁶⁾ その他、

Fig. 6. Effect of p22^{phox}/Nox4 RNAi or Probenecid on the PCS-induced Active TGF- β 1 Protein Secretion in HK-2 cells

** $p < 0.01$ versus w/o PCS; ## $p < 0.01$ versus PCS (1000 μ M).

Fig. 7. Nox4- and p22^{phox}-dependent Signaling Pathways Implicated in Tubular Cell Injury Triggered by PCS

PCS に関する最近の知見としては、IS と同様に Klotho 発現を低下させることに加え、²¹⁾ 腎における EMT に関連した renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)/TGF- β 経路の活性化を介して腎線維化を促進する作用等が報告されている。¹³⁾

心腎関連の観点からは、PCS が OAT の基質であることを考慮すると、IS と同様に OAT を発現している血管系並びに骨芽細胞等においても取り込まれ、毒素としての生理作用を有する可能性が推察さ

れるが、これらは今後の検討課題である。最近、興味深いことに、PCSは骨格筋のERK1/2の活性化を介してインスリン抵抗性を促進する作用を有することも報告されている。²⁷⁾

4. おわりに

これまでの臨床及び基礎研究により、ISやPCSといった血清タンパク結合性尿毒症物質の血清中濃度の上昇はCKDの進展に加え、その合併症であるCVD発症やミネラル/骨代謝異常に密接に関与することが明確になってきた。これら2つの尿毒症物質は腎臓、血管、骨に発現するOATを介して細胞内へと取り込まれ、NADPH oxidaseの活性化を介して細胞内ROS産生を亢進することで様々な毒素としての生理作用をもたらす。したがって、今後、CKD患者においてこれら尿毒症物質の体内蓄積を抑制すること、加えて、NADPH oxidaseを標的としたCKD状態における過剰なROS産生を制御する効果的な治療戦略の開発が求められる。²⁸⁾

謝辞 本研究は熊本大学薬学部薬剤学分野、丸山 徹教授のご指導の下で行ったものであり、この場を借りて心から感謝申し上げます。また、ご指導頂きました崇城大学薬学部、小田切優樹教授に厚く御礼申し上げます。貴重なご助言を賜りました東海大学医学部腎内分泌代謝内科、深川雅史教授に厚く御礼申し上げます。さらに、多大なご協力を頂きました熊本大学薬学部薬剤学分野、末永綾香講師並びに異島 優助教を始め、卒業生及び在校生の皆様深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Duranton F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., European Uremic Toxin Work Group, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23**, 1258–1270 (2012).
- 2) Liabeuf S., Barreto D. V., Barreto F. C., Meert N., Glorieux G., Schepers E., Temmar M., Choukroun G., Vanholder R., Massy Z. A., European Uremic Toxin Work Group (EUTox), *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 1183–1191 (2010).
- 3) Wu I. W., Hsu K. H., Hsu H. J., Lee C. C., Sun C. Y., Tsai C. J., Wu M. S., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **27**, 1169–1175 (2012).
- 4) Lin C. J., Pan C. F., Liu H. L., Chuang C. K., Jayakumar T., Wang T. J., Chen H. H., Wu C. J., *Atherosclerosis*, **225**, 173–179 (2012).
- 5) Watanabe H., Miyamoto Y., Otagiri M., Maruyama T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3682–3695 (2011).
- 6) Deguchi T., Ohtsuki S., Otagiri M., Takanaga H., Asaba H., Mori S., Terasaki T., *Kidney Int.*, **61**, 1760–1768 (2002).
- 7) Deguchi T., Nakamura M., Tsutsumi Y., Suenaga A., Otagiri M., *Biopharm. Drug Dispos.*, **24**, 345–355 (2003).
- 8) Deguchi T., Kusuhara H., Takadate A., Endou H., Otagiri M., Sugiyama Y., *Kidney Int.*, **65**, 162–174 (2004).
- 9) Deguchi T., Kouno Y., Terasaki T., Takadate A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **22**, 619–627 (2005).
- 10) Miyazaki T., Ise M., Seo H., Niwa T., *Kidney Int. Suppl.*, **62**, S15–S22 (1997).
- 11) Owada S., Goto S., Bannai K., Hayashi H., Nishijima F., Niwa T., *Am. J. Nephrol.*, **28**, 446–454 (2008).
- 12) Motojima M., Hosokawa A., Yamato H., Muraki T., Yoshioka T., *Kidney Int.*, **63**, 1671–1680 (2003).
- 13) Sun C. Y., Chang S. C., Wu M. S., *PLoS One*, **7**, e34026 (2012).
- 14) Chiang C. K., Tanaka T., Inag R., Fujita T., Nangaku M., *Lab. Invest.*, **91**, 1564–1571 (2011).
- 15) Masai N., Tatebe J., Yoshino G., Morita T., *Circ. J.*, **74**, 2216–2224 (2010).
- 16) Shimizu H., Hirose Y., Nishijima F., Tsubakihara Y., Miyazaki H., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **297**, C389–C396 (2009).
- 17) Muteliefu G., Enomoto A., Niwa T., *J. Ren. Nutr.*, **19**, 29–32 (2009).
- 18) Muteliefu G., Enomoto A., Jiang P., Takahashi M., Niwa T., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **24**, 2051–2058 (2009).
- 19) Nii-Kono T., Iwasaki Y., Uchida M., Fujieda A., Hosokawa A., Motojima M., Yamato H., Kurokawa K., Fukagawa M., *Kidney Int.*, **71**, 738–743 (2007).
- 20) Iwasaki Y., Yamato H., Nii-Kono T., Fujieda A., Uchida M., Hosokawa A., Motojima M.,

- Fukagawa M., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 2768–2774 (2006).
- 21) Sun C. Y., Chang S. C., Wu M. S., *Kidney Int.*, **81**, 640–650 (2012).
- 22) Miyamoto Y., Iwao Y., Tasaki Y., Sato K., Ishima Y., Watanabe H., Kadowaki D., Maruyama T., Otagiri M., *FEBS Lett.*, **584**, 2816–2820 (2010).
- 23) Martinez A. W., Recht N. S., Hostetter T. H., Meyer T. W., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 3430–3436 (2005).
- 24) Watanabe H., Noguchi T., Miyamoto Y., Kadowaki D., Kotani S., Nakajima M., Miyamura S., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1423–1428 (2012).
- 25) Miyamoto Y., Watanabe H., Noguchi T., Kotani S., Nakajima M., Kadowaki D., Otagiri M., Maruyama T., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **26**, 2468–2502 (2011).
- 26) Watanabe H., Miyamoto Y., Honda D., Tanaka H., Wu Q., Endo M., Noguchi T., Kadowaki D., Ishima Y., Kotani S., Nakajima M., Kataoka K., Kim-Mitsuyama S., Tanaka M., Fukagawa M., Otagiri M., Maruyama T., *Kidney Int.*, **83**, 582–592 (2013).
- 27) Koppe L., Pillon N. J., Vella R. E., Croze M. L., Pelletier C. C., Chambert S., Massy Z., Glorieux G., Vanholder R., Dugenet Y., Soula H. A., Fouque D., Soulage C. O., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **24**, 88–99 (2013).
- 28) Gorin Y., *Kidney Int.*, **83**, 541–543 (2013).