

氏名	なかがわ けいすけ 中川 恵輔
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙博薬第2号
学位授与の日付	令和4年6月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	尿毒素による血管弛緩機能障害とそのメカニズムの 解明に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 福森 亮雄 (副査) 教授 永井 純也 (副査) 教授 大喜 多守

論文内容の要旨

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) は、生活習慣の悪化や加齢など様々な要因により発症する。CKD の治療目標は、腎代替療法の導入回避に加えて、合併症の一つである心血管疾患 (cardiovascular disease : CVD) の発症を防ぐことである。また CKD の進行に伴い体内に蓄積する尿毒素は、CVD の原因の一つと考えられているが、尿毒素の血管機能への直接的な影響に関しては未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、尿毒素インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate : IS) およびキヌレニン (kynurenine : kyn) の血管機能への直接的な影響を検討した。また、一酸化窒素 (nitric oxide : NO) は血管機能維持において重要な役割を果たすが、スーパーオキシドアニオン (superoxide anion : O₂⁻) が過剰に存在する状態では生体利用能が低下するため、各尿毒素の O₂⁻ 産生に及ぼす影響も検討した。加えて、急性腎障害 (acute kidney injury : AKI) モデルラットを作製し、AKI に伴う血管内皮機能障害における IS の関与も検討した。

第一編において、ラット胸部大動脈に対する IS 曝露の影響を検討したところ、曝露時間および濃度に依存して acetylcholine (ACh) 誘発血管弛緩反応は減弱し、NO 供与体

sodium nitroprusside (SNP) に対する反応性も低下した。また血管内皮の有無に関わらず、IS は O₂⁻ 産生を顕著に亢進させたことから、IS により過剰に産生された O₂⁻ が、ACh および SNP 由来の NO を捕捉・不活化することで、それぞれの血管弛緩薬に対する血管反応性を低下させる可能性が示唆された。さらに血管内皮非除去血管に対する、ascorbic acid (抗酸化剤)、apocynin (NADPH oxidase 阻害薬)、CH223191 (アリール炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AhR) 阻害薬) の前処置は、IS 曝露に伴う ACh に対する血管反応性の低下並びに O₂⁻ 産生の増大を有意に改善した。このことから、IS は AhR に作用し、NADPH oxidase 活性を増強することで、O₂⁻ 産生を亢進させ各種血管弛緩薬に対する反応性の減弱を引き起こす可能性が考えられた。一方、血管内皮除去血管においては、apocynin および CH223191 前処置は IS 曝露に伴う SNP への血管反応性の低下および O₂⁻ 産生増大に対して何ら影響を及ぼさなかった。したがって、IS は AhR-NADPH oxidase 経路とは異なるシグナル伝達を介して、血管平滑筋における O₂⁻ 産生を亢進させることが示唆される。しかしながら、IS 曝露時の血管内皮除去血管における SNP への血管反応性の低下は、ascorbic acid によって部分的に改善されることから、IS は血管平滑筋においても O₂⁻ 産生を増大し、この増大が NO を介した血管弛緩反応の低下に一部寄与している可能性が考えられた。

第二編では、CKD において血管内皮機能障害マーカーと有意な相関を示す kyn の血管内皮機能に及ぼす直接的な影響について検討した。kyn 曝露により、血管内皮および血管平滑筋における O₂⁻ 産生は亢進し、ACh および SNP による NO 誘導性血管弛緩反応は減弱することが明らかとなった。また、血管内皮非除去血管に対する ascorbic acid および CH223191 の前処置は、kyn 曝露時の ACh に対する血管反応性の低下並びに O₂⁻ 産生増大を有意に改善したが、apocynin 処置は何ら影響を及ぼさなかった。したがって、血管内皮非除去血管における kyn 曝露の影響は先述した IS の作用とは異なり、AhR 刺激後に NADPH oxidase 非依存的な経路を介して生じることが明らかとなった。

腎疾患に併発する血管内皮機能障害は、CKD だけではなく虚血性 AKI においても観察されることから、第三編では腎障害発症後の胸部大動脈血管内皮機能の経時的変化や血管内皮機能障害における IS の関与について検討した。その結果、腎虚血再灌流処置 1 日後に血漿クレアチニンの増大、クレアチニンクリアランスの低下と血漿 IS 濃度の有意な上昇を認めたが、血管内皮機能には大きな変化はみられなかった。再灌流 7 および 28 日後においては、腎機能の回復に伴って血漿 IS 濃度も減少傾向を示したが、ACh に対する血管反応性は有意に低下した。特に再灌流 28 日後においては、血管反

応性の減弱の程度はより顕著となった。加えて、再灌流 28 日後の胸部大動脈では、顕著な O₂⁻ 産生の増大も確認された。そこで次に、虚血性 AKI に伴う血管内皮機能障害に対する IS の関与について検討した。球形吸着炭 AST-120 (IS の前駆体物質を吸着することで IS レベルを抑制) の虚血再灌流後の投与は、AKI 発症後の腎機能低下に対して何ら影響を及ぼさなかった。一方、AST-120 投与は再灌流 1 および 7 日後の血漿 IS 濃度を有意に低下させた。重要なこととして、AST-120 投与は再灌流 28 日後に観察された胸部大動脈の ACh に対する血管反応性の低下並びに O₂⁻ 産生増大を改善しなかった。以上のことから、再灌流直後に上昇した IS は、AKI 発症に伴う血管内皮機能低下および O₂⁻ 産生増大の主な原因分子ではないことが明らかとなった。ただし、今回観察された胸部大動脈血管内皮機能の低下そのものが AKI から CKD への移行要因の一つである可能性は否定できず、その過程あるいは結果として生じる IS は遠隔期における血管機能障害の進行に寄与するかもしれない。

以上、本稿において尿毒素 IS および kyn の血管機能に及ぼす影響とその作用メカニズム解析により得られた知見は、CKD を含めた各種腎疾患でみられる CVD に対して新たな予防薬・治療薬開発の一助になると考えられる。また AKI 発症後の血管内皮機能についての検討結果は、心腎血管連関の病態生理解明に貢献し、腎疾患に合併する CVD の制圧に寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) の患者数は、超高齢者の増加などもあり、年々増加しており、成人の 8 人に 1 人は CKD であると推定されている。CKD に対して血液透析などによる腎代替療法を行っても、合併症である心血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) の発症リスクが高く、それが死因の一つにもなっている。さらに CVD を合併する原因として、CKD の進展に伴い体内に蓄積する尿毒素が考えられてはいるものの、尿毒素の血管機能への直接的な影響に関しては不明な点が多い。そこで、腎機能障害により蓄積する尿毒素が、CVD の中心病態となる血管弛緩機能に与える影響及びその機序を解明するため、以下の研究を行った。

第 1 編では血液透析では除去しにくい尿毒素インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS) の血管弛緩機能に与える影響及びその機序を解明する研究を行った。具体的には、迅速摘出ラット胸部大動脈をマグヌス管内で観察する *ex vivo* 法で、IS 曝露による、acetylcholine (ACh) 及び一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 供与体 sodium nitroprusside (SNP) 誘発性の血管弛緩機能を評価した。その結果、IS 曝露により、血管弛緩反応は低下しており、さらに、活性酸素種スーパーオキシドアニオン (superoxide anion: O₂⁻) 産生も著しく亢進していた。このことから、IS により過剰に産生された O₂⁻が、強力な血管弛緩作用物質である NO を捕捉・不活化することで、血管弛緩反応を低下させた可能性が考えられた。さらにこの活性酸素生成系の阻害剤を用いた解析などから、IS は血管内皮のアリール炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) に作用し、NADPH oxidase 活性を増強することで O₂⁻産生を促進し、一方血管平滑筋においては上述した経路とは異なるシグナル伝達を介して O₂⁻産生を引き起こすことが示唆された。

次に、第 2 編では、血管内皮機能障害マーカーと有意な相関を示すことが報告されている尿毒素キヌレニン (kynurenine: kyn) の血管機能に及ぼす影響について同様の方法で検討した。ラット胸部大動脈に対する kyn 曝露は、血管内皮および血管平滑筋における O₂⁻産生を促進し、ACh および SNP による NO 誘導性血管弛緩反応を減弱させた。また、血管内皮非除去血管に対する ascorbic acid および CH223191 の前処置は、kyn 曝露時の ACh に対する血管反応性の低下並びに O₂⁻産生増大を有意に改善したが、apocynin 処置は何ら影響を及ぼさなかった。すなわち、kyn 曝露に伴う O₂⁻過剰産生は、AhR 刺激作用に依存するが、NADPH oxidase 非依存的な経路を介

することが示唆された。

第3編では、急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) モデルラットに併発する CVD を調べるアプローチをとった。虚血性 AKI は、原発巣である腎動脈の血管内皮機能低下だけではなく、遠隔臓器である胸部大動脈においても同様の現象が認められ、多臓器障害への連鎖を起こす。まず、ラットに腎虚血再灌流処置を行い、虚血性 AKI モデルラットを作成した。作成したモデルラットは再灌流 1 日後に顕著な腎機能の低下を認めたが、7 および 28 日後においては、腎機能は回復傾向を示した。一方、血管弛緩機能は処置 1 日後に大きな変化はみられなかったが、徐々に悪化し、再灌流 28 日後には、著明な血管弛緩反応の低下がみられた。著者らは血管弛緩反応の悪化の原因物質候補として、AKI により生じた尿毒素である IS を疑った。実際、本モデルラットでは再灌流 1 日後には IS は著明に増加していた。そこで、IS の前駆体の吸着剤であるクレメジン (AST-120) 投与により、血管弛緩機能が改善するか調べた。しかし、AST-120 投与により、血漿中の IS は低下していたにもかかわらず、再灌流 28 日後においても、血管弛緩反応の改善は見られなかった。従って、再灌流直後に上昇した IS は、AKI 発症に伴う血管内皮機能低下および O₂-産生増大の主な原因分子ではないことが示唆された。

現在、CKD に伴う血管機能障害に対する有効な治療法は存在せず、CKD に伴う血管内皮機能障害およびその後の CVD に対する治療薬の開発が求められている。本研究では、尿毒素 IS および kyn が血管組織の AhR を介して O₂-過剰産生を誘発し、血管緊張調節において重要な役割を担う NO を捕捉・不活化することが示された。さらに AhR 阻害薬が尿毒素による血管弛緩機能の低下を改善する作用を持つことが示唆されたことから、本研究結果は CKD に伴う CVD に対して新たな予防薬・治療薬の開発の一助になると考えられた。また AKI 発症後の血管内皮機能を検討する研究は心腎血管連関の病態生理の解明に貢献し、AKI に合併する CVD の治療法開発に寄与すると考えられた。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。