

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

2022

中川 恵輔

## 目 次

緒言 .....	1
第 1 編 尿毒素インドキシル硫酸のラット胸部大動脈に対する影響 .....	3
第 1 章 ラット胸部大動脈に対するインドキシル硫酸急性曝露が一酸化窒素を介した血管弛緩 反応およびスーパーオキシドアニオン産生に与える影響 .....	3
第 2 章 ラット胸部大動脈に対するインドキシル硫酸急性曝露が可溶性グアニル酸シクラーゼ およびアデニル酸シクラーゼを介した血管弛緩反応に与える影響 .....	13
第 2 編 尿毒素キヌレニンのラット胸部大動脈に対する影響 .....	19
第 1 章 ラット胸部大動脈に対するキヌレニン急性曝露が一酸化窒素を介した血管弛緩反応お よびスーパーオキシドアニオン産生に与える影響 .....	19
第 3 編 虚血性急性腎障害に伴う血管内皮機能障害に対するインドキシル硫酸の寄与 .....	29
第 1 章 腎虚血再灌流後の腎機能および血管内皮機能の経時的変化に関する検討 .....	29
第 2 章 腎虚血再灌流に伴う血管内皮機能障害に対する再灌流直後の球形吸着炭 AST-120 投与の影響 .....	37
結語 .....	47
論文目録 .....	48
謝辞 .....	49
参考文献 .....	50

## 緒 言

生活習慣の悪化や加齢など、様々な要因により慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は発症する。CKD の患者数は年々増加の一途を辿っており、日本人の CKD 患者数は約 1330 万人と推計され、成人の約 8 人に 1 人は CKD であると言われている<sup>1)</sup>。CKD の第一の治療目標は、末期腎不全 (end-stage renal disease: ESRD) への移行と腎代替療法の導入を回避することである。さらにもう一つの重要な治療目標として、CKD の合併症の一つである心血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) の発症を防ぐことが挙げられる。実際に、CKD 患者においては腎機能の低下に伴って CVD の発症率は高くなることが明らかにされているため、CKD と CVD は密接な関係を有していることが示唆される<sup>2,3)</sup>。また CKD などの腎疾患に併発する CVD は、腎疾患特有の病態を考慮する必要がある。例えば、体液貯留によるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進や腎性貧血などが挙げられる<sup>4,5)</sup>。さらに、近年着目されているのは尿毒素 (尿毒症物質) である。CKD の進展に伴い、尿中への代謝産物の排泄障害により様々な尿毒素が体内に蓄積する<sup>6,7)</sup>。尿毒素は、①水溶性低分子、②水溶性中分子および③血清タンパク質結合性分子の 3 つのグループに大別される<sup>8)</sup>。なかでも③血清タンパク質結合性分子は、血清中に豊富に存在するアルブミンと強固に結合するため、透析による排除が困難であり、血管機能など生体に及ぼす影響が懸念されている<sup>9)</sup>。しかしながら、尿毒素の血管機能への直接的な影響に関しては、未だ不明点が多く残されている。

CKD の発症原因の一つに、急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) が挙げられる<sup>10,11)</sup>。AKI とは、正常腎の排泄機構を主体とする腎機能が急激に低下した状態をいい、人口 100 万人当たり年間約 500 例程度の割合で発症している<sup>12)</sup>。従来、AKI は「完治可能な病態」と考えられていたが、近年は致死率が高いだけでなく、CKD および ESRD へと移行し、透析導入率が高いことも報告されている<sup>13,14)</sup>。このように AKI が CKD に移行すること (AKI to CKD) は疫学的には明らかにされており、その移行メカニズムについては国内外を問わず幾多の研究が行われているが、未だ十分には解明されていない。現時点において、AKI to CKD のメカニズム探索に関しては、「腎臓内に着目した研究」が幅広く行われている。例えば、AKI においてみられる近位尿細管単独の障害は、近傍の線維芽細胞の形質転換を惹起することで線維化を促進し、さらには糸球体硬化

や遠位尿細管障害など、広範なネフロン障害を誘発することが報告されている<sup>15)</sup>。一方、AKI は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の過剰産生および炎症性サイトカインの産生を介して、中枢神経系、肺、肝臓および心臓など様々な遠隔臓器において、機能障害を引き起こすことが知られている<sup>16-19)</sup>。特に着目すべきは心腎連関の概念、すなわち AKI 発症後は心不全や心筋梗塞などの CVD の発症率が増大し、CVD 発症に伴う循環不全が腎機能のさらなる悪化や腎組織障害を導く可能性が考えられる。また、CVD の発症と大血管の内皮機能低下は強い相関を示すことは明らかにされている<sup>20)</sup>。しかしながら、AKI 発症後の胸部大動脈血管内皮機能の変動に関する詳細な検討は現状皆無である。

本研究では第一に、代表的な血清タンパク質結合型尿毒素であり、かつ CKD に伴う血管内皮機能障害の主要な原因の一つと考えられているインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS) の胸部大動脈血管機能に及ぼす影響とその作用メカニズムに関して検討した。IS は、血管内皮および血管平滑筋において ROS の一種であるスーパーオキシドアニオン (superoxide anion:  $O_2^-$ ) 産生を顕著に亢進させ、主要な血管弛緩物質である一酸化窒素 (nitric oxide: NO) を不活化することで血管反応性を低下させることが示された。次に、近年 CKD などの腎疾患において、血管内皮機能障害マーカーと有意な相関を示すことが報告されている<sup>21, 22)</sup>、血清タンパク質結合型尿毒素キヌレニン (kynurenine: kyn) の血管機能に及ぼす影響についても検討し、kyn は IS と同様に血管内皮および血管平滑筋において  $O_2^-$  産生を促進させ、NO を捕捉・不活化することが示された。最後に、虚血性 AKI 発症後において、胸部大動脈の血管内皮機能を経時的に評価した。腎虚血再灌流処置により腎機能が顕著に低下した際の血管内皮機能は正常であった。しかしながら、その後の経時的な腎機能の回復とは相反して、内皮機能障害は進行していることを確認した。さらに、再灌流後一過性に増大する IS は、虚血性 AKI に伴う血管内皮機能の破綻には関与しないことも明らかにした。

本論文では、IS および kyn の血管機能への直接的な影響と、その作用メカニズムに関する検討、さらには虚血性 AKI と血管内皮機能との関連を 3 編に分けて詳述する。

## 第 1 編 尿毒素インドキシル硫酸のラット胸部大動脈に対する影響

### 第 1 章 ラット胸部大動脈に対するインドキシル硫酸急性曝露が一酸化窒素を介した血管弛緩反応およびスーパーオキシド産生に与える影響

#### 1. 緒言

正常な血管内皮機能の維持は、心血管系の恒常性維持において非常に重要である。血管内皮細胞に存在する一酸化窒素(nitric oxide:NO)合成酵素(NO synthase:NOS)により産生された NO は、隣接する平滑筋細胞に拡散し、主に可溶性グアニル酸シクラーゼ(soluble guanylate cyclase:sGC)の活性化とその後の cGMP 産生を介して血管拡張作用や抗炎症作用などの生理学的機能を発揮する<sup>23, 24)</sup>。一方、生体中においてこの生理活性物質の生体利用能を低下させる原因の一つに、スーパーオキシドアニオン(superoxide anion:O<sub>2</sub><sup>-</sup>)に代表される活性酸素種(reactive oxygen species:ROS)による NO の不活化が挙げられる<sup>25)</sup>。事実、CKD(chronic kidney disease:CKD)患者および種々の CKD モデルラットにおいて、ROS の上昇に伴い NO の生体利用能の低下だけではなく、血管内皮機能障害が惹起される可能性が示唆されている<sup>26, 27)</sup>。例えば、CKD 患者においては、抗酸化物質の一つである ascorbic acid(i.v.)により血漿中 ROS 産生量は抑制され、皮膚加熱に応答した血管拡張反応の低下は有意に改善されることが報告されている<sup>28)</sup>。

これまでに実施された臨床試験において、CKD 患者では健常者と比較し、血管内皮機能の指標の一つである血流依存性拡張反応の顕著な低下が確認されている<sup>29)</sup>。加えて、血中インドキシル硫酸(indoxyl sulfate:IS)濃度を低下させる経口球形吸着炭製剤 AST-120 の 24 週間に渡る服用は、服用前と比較し、血管内皮機能を有意に改善することが明らかにされている<sup>29)</sup>。培養細胞を用いた検討においても、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells:HUVEC)に対する IS 曝露は、IS 濃度およびその処置時間に依存して ROS 産生を亢進させること、またこの ROS 産生の増加に伴って NO 産生量は減少することが報告されている<sup>30, 31)</sup>。さらに IS の ROS 産生亢進のメカニズムとして、IS はダイオキシン類などの環境汚染物質が結合する受容体の一つアリール炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor:AhR)に結合後、ROS 産生の主要な酵素の一つである NADPH oxidase を活性化することが明らかにされている<sup>32)</sup>。

上述の通り、IS と血管内皮機能には、密接な関係があると推察できるが、IS の血管機能に対する直接的な影響は十分に明らかにされていない。そこで本章では、IS の血管機能に対する影響を、IS による ROS 産生と血管機能維持において重要な役割を担う NO との関連性に着目し、検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2-1 実験動物

実験動物として、8～10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは一定の照明(明期 12 時間)、恒温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )、恒湿( $55 \pm 5\%$ )の条件下で飼育した。

### 2-2 大動脈リング標本の作製

深麻酔下において、血液凝固を防ぐことを目的に heparin (1000 U/kg) を頸静脈へ投与し、その後速やかに胸部大動脈を摘出した。摘出した大動脈から注意深く結合組織および脂肪組織を除去し、3～5 mm のリング標本作製した。また同時に、綿棒を用いて血管内側の表面を注意深く擦過することにより内皮細胞除去標本も作製した。作製した大動脈リング標本は、 $37^\circ\text{C}$  に保ったマグヌス管内に 1.5 g の静止張力で懸垂した。栄養液として 95%  $\text{O}_2$  -5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを通気することにより pH を 7.3-7.6 に調整した Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液を用いた。いくつかの実験においては、Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA、4%) を加え、ヒトの血中アルブミン濃度を模倣した。各種血管作動性物質による反応は、アイソメトリックトランスデューサー (TB-612T、日本光電) を介して連続的にポリグラフ (RM 6000、日本光電) 上に記録した。

### 2-3 大動脈リング標本における各種血管作動性物質の反応

マグヌス管内にリング標本を懸垂後、60 分間安定化させ、その間 15 分ごとに緩衝液を交換した。IS 曝露の実験開始前に、phenylephrine (Phe、 $10^{-6}$  M) を添加して血管を収縮させた。次いで acetylcholine (ACh、 $10^{-6}$  M) を添加し、Phe の収縮に対して 90% 以上の弛緩反応を認めることで、内皮細胞の存在を確認した。内皮除去標本においては、ACh ( $10^{-6}$  M) 添加による弛緩反応を認

めず、また NO 供与体 sodium nitroprusside (SNP、 $10^{-6}$  M) が弛緩反応を示すことで血管内皮の除去を確認した。その後、血管を洗浄し、30 分以上の安定放置を行なった。次いで、血管を IS (250、500 および 1000  $\mu$ M) 存在下のマグナス管内で 1 時間または 4 時間処置し、その後、Phe により血管を前収縮させた。Phe による前収縮が安定した後、ACh ( $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$  M) および SNP ( $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$  M) を累積的に添加することで、血管機能を評価した。なお血管弛緩反応は各標本の Phe による前収縮を 100% とし、前収縮に対するパーセント変化として表示した。また IS による血管機能障害のメカニズムを調べる検討においては、IS 添加 30 分前に NADPH oxidase 阻害薬 apocynin (100  $\mu$ M)、抗酸化剤 ascorbic acid (100  $\mu$ M) および AhR 阻害薬 CH223191 (10  $\mu$ M) をそれぞれ添加した。

#### 2-4 胸部大動脈における $O_2^-$ 産生の測定

大動脈における  $O_2^-$  産生は、 $O_2^-$  と特異的に反応する lucigenin を用いた化学発光法により測定した。大動脈リング標本は 2-2 項と同様の方法で準備した。大動脈リング標本を、95%  $O_2$  -5%  $CO_2$  混合ガスを通気した Krebs-HEPES 緩衝液 (pH 7.4, 37°C) が充填されたテストチューブに入れ、IS (500  $\mu$ M) および AhR 刺激薬 benzo (a) pyrene (BaP, 2  $\mu$ M) を添加し、4 時間反応させた。さらに阻害薬の影響を調べる実験では、2-3 項と同様に IS および BaP を添加する 30 分前に、apocynin、ascorbic acid、CH223191 並びに非選択的 NOS 阻害薬 NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME、100  $\mu$ M) を処置した。その後、ルミノメーター (Lumat 3, BELTHOLD TECHNOLOGIES) 中にて lucigenin (5  $\mu$ M) を添加し、lucigenin と  $O_2^-$  の反応により生じた光子を計測した。血管非存在下における発光をバックグラウンドとして血管存在下における計測値から差し引いた。ルミノメーターの計測値は Relative Light Unit (RLU) として表示され、乾燥血管重量 1 mg あたり、計測時間 1 分あたりの RLU を血管からの  $O_2^-$  産生量とした。

#### 2-5 使用薬物

ACh (Sigma-Aldrich)、ascorbic acid (富士フィルム和光純薬株式会社)、IS (Sigma-Aldrich)、L-NAME (東京化成工業株式会社)、Phe (ナカライテスク株式会社) および SNP (Sigma-Aldrich) は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にて溶解した。Apocynin (東京化成工業株式会社)、BaP

(Sigma-Aldrich) および CH223191 (Cayman Chemical 社) は dimethyl sulfoxide (DMSO、ナカライテスク株式会社) を用いて溶解した。Lucigenin (ナカライテスク株式会社) は超純水にて溶解した。

## 2-6 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較の場合 Student の unpaired t 検定を用いた。また、3 群以上の有意差検定は多重比較検定を用いた。すなわち、一元配置分散分析 (one-way ANOVA test) を行い、有意差が認められた場合、Dunnett's test を用いて検定を行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。

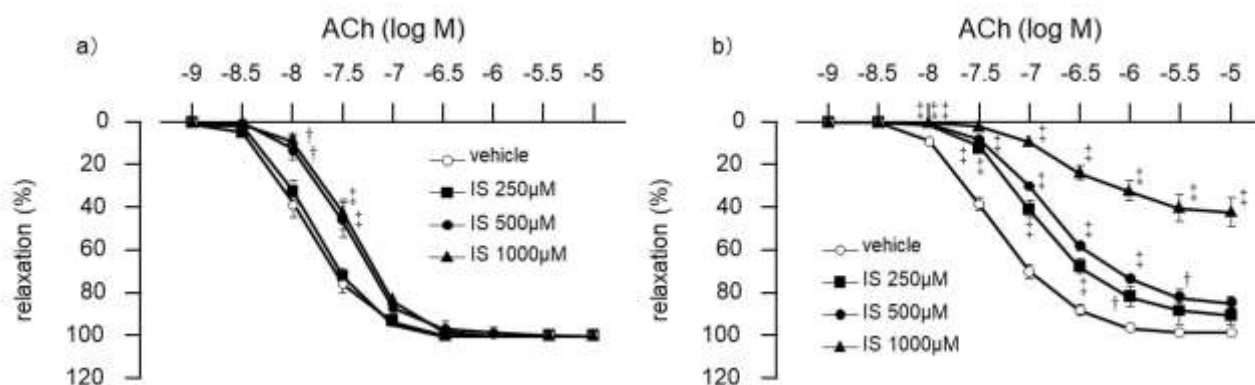
## 3. 実験結果

### 3-1 ACh 誘発血管弛緩反応に対する IS 曝露の影響

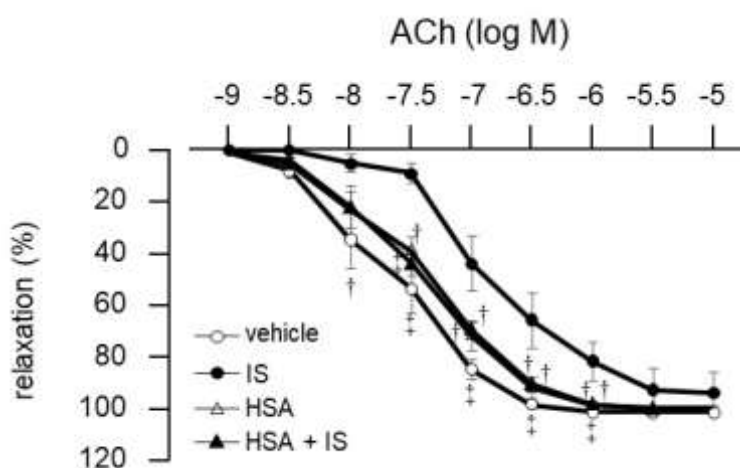
まず初めに、ラット胸部大動脈に対する IS の急性曝露が、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩反応に影響するか否かを検討した。Figure 1a に示すように、1 時間の IS 曝露は vehicle と比較し、IS 500  $\mu\text{M}$  および 1000  $\mu\text{M}$  において ACh 誘発血管弛緩反応を同程度かつ有意に減弱させた。なお、IS 250  $\mu\text{M}$  は何ら影響を及ぼさなかった。次に IS 4 時間曝露を検討した結果、IS 濃度依存性かつ有意な血管弛緩反応の低下が認められた (Figure 1b)。なお、血液透析を実施している CKD 患者の血清 IS 濃度は、約 330  $\mu\text{M}$ ～550  $\mu\text{M}$  であることが報告されている<sup>33)</sup>。したがって、より長時間および適切な濃度での IS 曝露を行うために、IS 曝露時間は 4 時間、処置濃度は 500  $\mu\text{M}$  を実験条件として、これ以降の検討を行った。

IS は血中におけるタンパク結合率が非常に高いため、マグヌス内においてより生体内を模倣すべく、HSA 存在下における IS の血管機能に及ぼす影響を検討した。その結果、Figure 1b で示した IS による ACh 誘発血管弛緩反応の低下は、HSA 存在下では観察されなかった (Figure 2)。





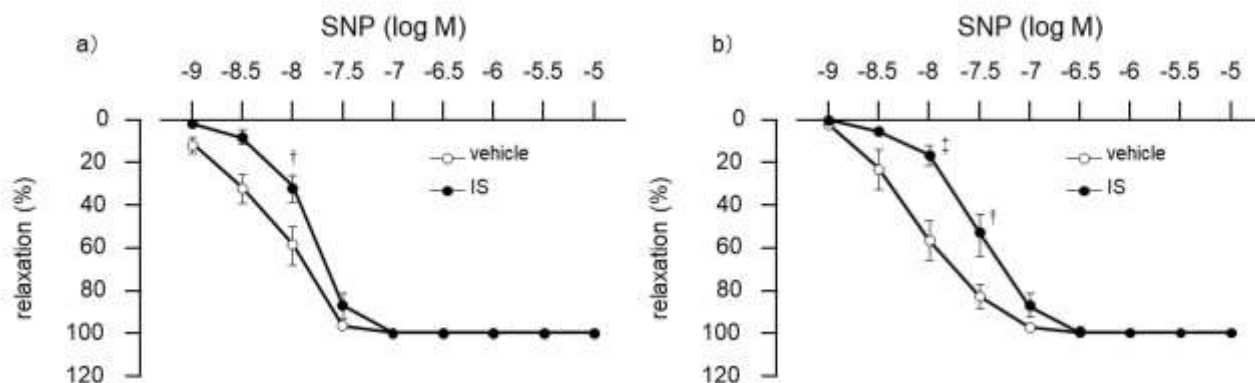
**Figure 1.** Influences of IS exposure on the ACh-induced vasorelaxation response in the endothelium-intact vascular rings. (a) Addition of IS for 1 hour and (b) addition of IS for 4 hours. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-6 experiments.  $^{\dagger} P < 0.05$  and  $^{\ddagger} P < 0.01$ , compared with vehicle. ACh, acetylcholine; IS, indoxyl sulfate.



**Figure 2.** Influences of IS exposure on the ACh-induced vasorelaxation response in the presence of HSA. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments.  $^{\dagger} P < 0.05$  and  $^{\ddagger} P < 0.01$ , compared with IS. ACh, acetylcholine; HSA, human serum albumin; IS, indoxyl sulfate.

### 3-2 SNP 誘発血管弛緩反応に対する IS 曝露の影響

次に、NO 供与体 SNP 誘発血管弛緩反応に対する IS 曝露の影響について検討したところ、血管内皮の有無に関わらず、IS 曝露は SNP に対する血管反応性を有意に減弱させた (Figure 3)。

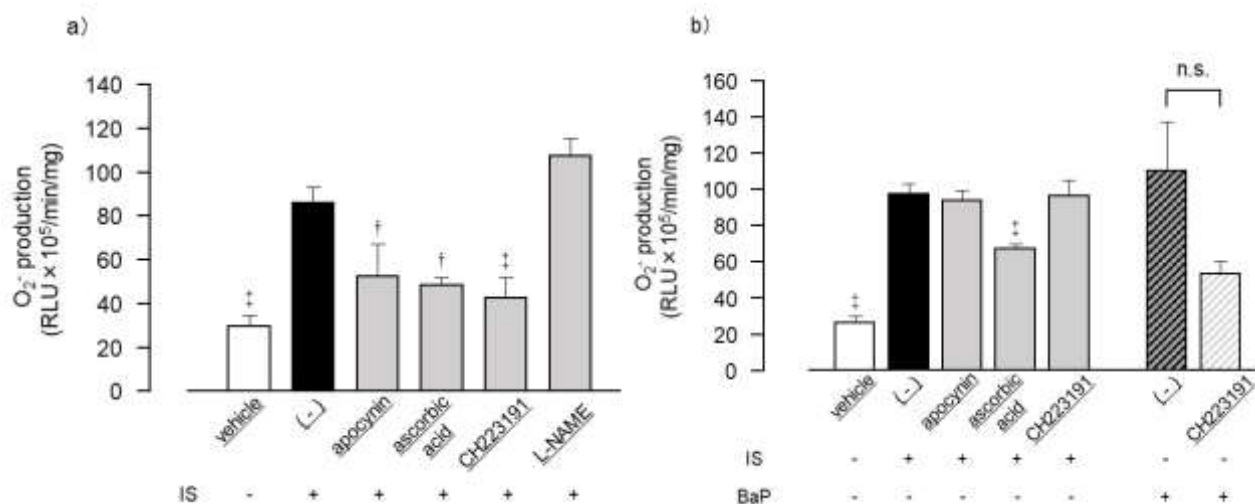


**Figure 3.** Influences of IS exposure on the SNP-induced vasorelaxation response in (a) the endothelium-intact vascular rings and (b) the endothelium-denuded vascular rings. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 experiments.  $^{\dagger} P < 0.05$  and  $^{\ddagger} P < 0.01$ , compared with vehicle. SNP, sodium nitroprusside; IS, indoxyl sulfate.

### 3-3 ラット胸部大動脈に対する IS 曝露が $O_2^-$ 産生に及ぼす影響

血管内皮非除去血管を用いた検討において、IS 曝露は vehicle と比較し、顕著な  $O_2^-$  産生を引き起こした。またその増加は、apocynin (NADPH oxidase 阻害薬)、ascorbic acid (抗酸化剤) および CH223191 (AhR 阻害薬) の前処置により有意に抑制された。一方、L-NAME (NOS 阻害薬) 前処置は IS 誘発  $O_2^-$  産生には何ら影響を及ぼさなかった (Figure 4a)。

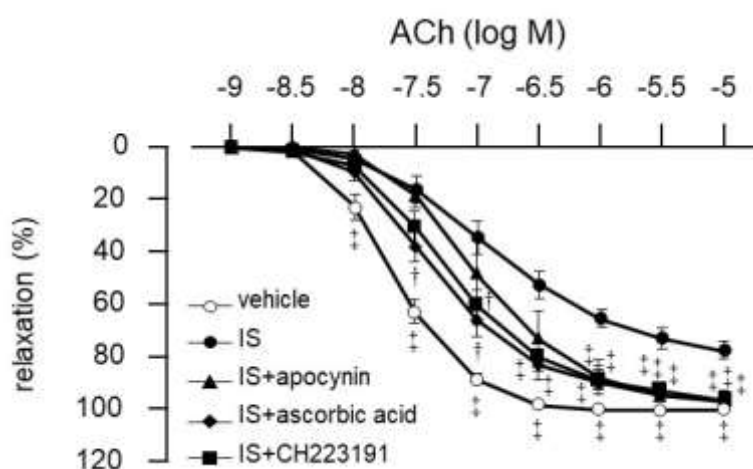
同様に、血管内皮除去血管に対する IS 曝露は、血管内皮非除去血管と同程度かつ有意に  $O_2^-$  産生を亢進させた。また IS 曝露に伴う  $O_2^-$  の増加は、ascorbic acid 前処置により有意に抑制されたが、apocynin および CH223191 前処置の影響はみられなかった。なお、AhR 刺激薬 BaP 処置で観察された顕著な  $O_2^-$  産生の増加を、CH223191 前処置は有意ではないものの抑制傾向を示した (Figure 4b)。



**Figure 4.** Influences of IS exposure on the  $O_2^-$  production in (a) the endothelium-intact vascular rings and (b) the endothelium-denuded vascular rings. Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 experiments. †  $P < 0.05$  and ‡  $P < 0.01$ , compared with IS addition. RLU, relative light units; IS, indoxyl sulfate;  $O_2^-$ , superoxide anion; BaP, benzo(a)pyrene; n.s., not significant.

### 3-4 内皮非除去血管の IS 曝露により生じる ACh 誘発血管弛緩反応低下に対する各種阻害薬の影響

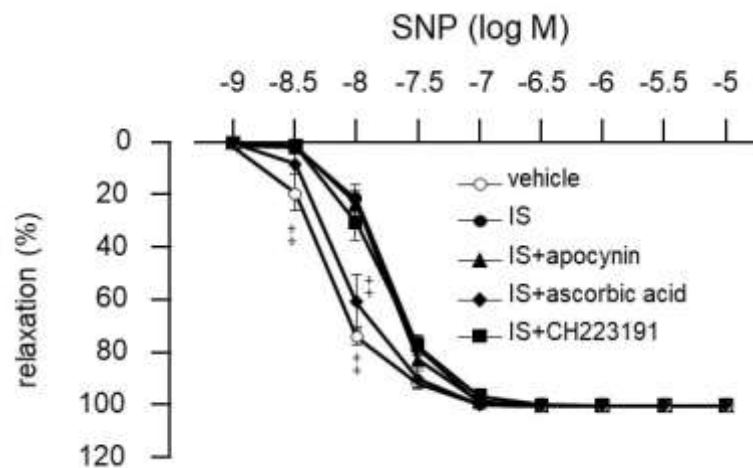
3-1 項 (Figure 1b) の結果と同様に、4 時間の IS (500  $\mu$ M) 曝露は ACh 誘発血管弛緩反応を顕著に減弱させたが、apocynin、ascorbic acid および CH223191 前処置によりその減弱は有意に抑制された (Figure 5)。



**Figure 5.** Effects of apocynin, ascorbic acid and CH223191 on the reduction of ACh-induced vasorelaxation response in the endothelium-intact vascular rings by IS exposure. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments.  $^{\dagger} P < 0.05$  and  $^{\ddagger} P < 0.01$ , compared with IS. ACh, acetylcholine; IS, indoxyl sulfate.

### 3-5 内皮除去血管の IS 曝露により生じる SNP 誘発血管弛緩反応低下に対する各種阻害薬の影響

3-2 項 (Figure 3b) の結果と同様に、IS 曝露に伴い SNP に対する血管反応性は著明に低下したが、ascorbic acid 前処置はその低下を有意に抑制した。しかしながら、apocynin および CH223191 は何ら影響を及ぼさなかった (Figure 6)。



**Figure 6.** Effects of apocynin, ascorbic acid and CH223191 on the reduction of SNP-induced vasorelaxation response in the endothelium-denuded vascular rings by IS exposure. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments.  $^{\ddagger} P < 0.01$ , compared with IS. SNP, sodium nitroprusside; IS, indoxyl sulfate.

## 4. 考察

本研究にてラット胸部大動脈に対する IS 曝露は、IS の曝露時間および濃度に依存して ACh 誘発血管弛緩反応を減弱させることが明らかとなり、同様に SNP に対する反応性も IS 曝露により低下することが示された。また、血管内皮の有無に関わらず、IS は  $O_2^-$  産生を顕著に亢進させることも明らかとなった。このことから、IS により過剰に産生された  $O_2^-$  が、ACh および SNP 由来の NO を捕捉することにより、それぞれの血管弛緩薬に対する血管反応性を低下させている可能性

が示唆された。

HUVEC を用いた実験において、IS は細胞質に存在する AhR に結合し、AhR の核内移行を促進することが報告されている<sup>32)</sup>。さらに、AhR の核内移行に伴って NADPH oxidase 活性は亢進し、これが ROS 産生増加の原因であることも明らかにされている<sup>34)</sup>。本研究において、血管内皮非除去血管の IS 曝露により生じる  $O_2^-$  産生の亢進は、apocynin、ascorbic acid、CH223191 前処置によって有意に抑制された。また ACh に対する血管反応性の低下も、これら薬物の前処置によって有意に改善された。これらのことから、IS は AhR に作用し、NADPH oxidase 活性を増強し、 $O_2^-$  産生を亢進している可能性が考えられる。

Matsumoto らは、ラット胸部大動脈に対する IS 曝露に伴う血管内皮機能障害には、NADPH oxidase 活性上昇は関与しないと報告している<sup>35)</sup>。本研究結果との不一致の理由としては、IS の曝露時間並びに濃度の違いが影響していると考えられる。すなわち、本研究は IS 500  $\mu$ M を 4 時間処置しているのに対し、Matsumoto らは、IS 100  $\mu$ M を 30 分処置している。IS が結合する AhR は核内に移行後、芳香族炭化水素受容体核内輸送体 (Arnt) と二量体を形成する。AhR:ligand (IS):Arnt 三量体は、プロモーター配列である xenobiotic responsive element (XRE) に結合し、多くの遺伝子の転写を促進する<sup>36)</sup>。例えば、NADPH oxidase のサブユニットの一つである p40phox の遺伝子もその一つであり、IS は p40phox 遺伝子発現の増大と、それに伴った NADPH oxidase 活性の上昇を引き起こすことが報告されている<sup>37)</sup>。実際に、HUVEC に IS を 20 時間処置すると、IS の濃度依存的に AhR の核内移行が促進されること<sup>38)</sup>、また別の報告では、IS 添加による ROS 産生は IS の濃度依存的かつ経時的に増加し、この増加は apocynin により抑制されることも確認されている<sup>31)</sup>。したがって、内皮細胞における IS 添加により生じる NADPH oxidase 依存的な ROS 産生は、IS の処置濃度並びに曝露時間が重要であると推察される。

IS は内皮細胞だけでなく血管平滑筋細胞においても、NADPH oxidase 活性化を介した ROS 産生を亢進させることが、培養細胞を用いた実験で明らかにされている<sup>39)</sup>。また、血管平滑筋細胞において IS は、AhR に作用することも示されている<sup>40)</sup>。本研究では、血管内皮除去血管に対する IS 曝露は、 $O_2^-$  産生を亢進し、SNP 誘発血管弛緩反応を有意に減弱させたが、apocynin および CH223191 はこれらの変化に何ら影響を与えなかった。一方、AhR 刺激薬 BaP による  $O_2^-$  産生は、CH223191 により抑制された。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  $O_2^-$  産生を亢進させることが示唆される。なお、血管内皮除去血管に対する IS の影響は 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  $O_2^-$  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示唆される。

本研究結果から、IS による  $O_2^-$  産生増大は、血管内皮および血管平滑筋において異なるメカニズムを介していることが明らかになったが、その要因の一つとして血管組織における AhR の発現レベルの違いが今回の実験結果に影響している可能性も考えられる。AhR は血管内皮および血管平滑筋いずれの細胞内にも発現しているが、血管内皮の方がその発現はより顕著であると報告されている<sup>41, 42)</sup>。このことから、本研究で用いた内皮除去血管の血管平滑筋における AhR の発現レベルの低さが、既報の培養細胞の結果と一致しない理由の一つになるかもしれない。今後、摘出血管の血管内皮および血管平滑筋それぞれにおける AhR 発現レベルについて、詳細な検討が必要と考えられる。

本研究では、HSA 存在下の実験において、IS 曝露による血管弛緩反応への影響を認めなかった。一般に、健常状態の体内における IS は蛋白結合率が非常に高く、総 IS 濃度の約 10% のみが遊離体として血中に存在することが明らかにされている<sup>6)</sup>。一方、HUVEC<sup>31)</sup>、ヒト肝癌由来細胞株<sup>43)</sup> および腎近位尿細管細胞株<sup>44)</sup> に対する IS 曝露の影響は、アルブミンの有無に関わらずその影響が認められている。しかしながら本研究では、アルブミン存在下において、IS 曝露に伴う ACh 誘発血管弛緩反応の低下は認められなかった。この原因として、異なる実験条件、すなわち *in vitro* と *ex vivo* の違いが大きく影響している可能性が考えられた。また、CKD の進展に伴い血中 IS レベルが上昇するだけではなく、糸球体障害による尿蛋白排泄量の増加に伴って、血中アルブミン濃度は著明に低下する<sup>45)</sup>。したがって、CVD が発症しやすい重度の CKD 患者においては、遊離体の IS がより増加し易い状態と考えられるため、アルブミン非存在下において IS 曝露の影響を検討した本実験の臨床的意義は大きいと考えられる。

本章において、摘出血管に対する IS 曝露は血管内皮および血管平滑筋における  $O_2^-$  産生を増大させ、この増大が NO 依存性血管弛緩反応の減弱に大きく寄与することが示された。

## 第 1 編 尿毒素インドキシル硫酸のラット胸部大動脈に対する影響

### 第 2 章 ラット胸部大動脈に対するインドキシル硫酸急性曝露が可溶性グアニル酸シクラーゼおよびアデニル酸シクラーゼを介した血管弛緩反応に与える影響

#### 1. 緒言

前章で述べた通り、血管緊張調節において極めて重要な物質である NO は、ROS により捕捉・不活化される<sup>25)</sup>。また、NO の受容体として機能する sGC も ROS の影響を受けることが広く知られている。sGC には、NO によって活性化される還元型 sGC、活性化されない酸化型 sGC 並びにヘム欠失型 sGC の 3 種類が存在する<sup>46)</sup>。ROS が過剰に存在する状態では、タンパク質は酸化的修飾を受けるが、当然のことながら sGC もその例外ではない。すなわち、ROS により sGC の酸化還元状態は変化し、それに伴って sGC の NO に対する感受性も変動する。これらのことから、本章においては NO 非依存的に sGC を直接刺激する sGC 刺激薬を用いて、IS の sGC 機能に対する影響を検討した。また、NO/sGC 経路以外の血管弛緩に対する IS の影響を検討するため、アデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase: AC) 活性化薬 forskolin に対する血管反応性についても検討を行った。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 実験動物

実験動物として、8～10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは一定の照明 (明期 12 時間)、恒温 ( $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )、恒湿 ( $55 \pm 5\%$ ) の条件下で飼育した。

##### 2-2 大動脈リング標本の作製

8～10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットより第 1 編第 1 章 2-2 項と同様の方法にて大動脈リング標本作製し、実験を行った。実験条件は第 1 編第 1 章 2-2 項と同様の条件にて行った。

##### 2-3 大動脈リング標本における各種血管作動性物質の反応

マグヌス管内にリング標本を懸垂後、60 分間安定化させ、その間 15 分ごとに緩衝液を交換し

た。実験開始前に、Phe ( $10^{-6}$  M) を添加して血管を収縮させた。次いで ACh ( $10^{-6}$  M) を添加し、Phe の収縮に対して 90% 以上の弛緩反応を認めることで、内皮細胞の存在を確認した。内皮除去標本においては、ACh ( $10^{-6}$  M) 添加による弛緩反応を認めず、また SNP ( $10^{-6}$  M) が弛緩反応を示すことで血管内皮の除去を確認した。その後、血管を洗浄し、30 分以上の安定放置を行なった。次いで血管を IS (500  $\mu$ M) 存在下のマグヌス管内において 4 時間放置し、その後、Phe により血管を前収縮させた。Phe による前収縮が安定したのち、sGC 刺激薬 BAY 41-2272 ( $10^{-10}$  ~  $10^{-5}$  M) および AC 活性化薬 forskolin ( $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$  M) を累積的に添加し、血管機能を評価した。なお血管弛緩反応は各標本の Phe による前収縮を 100% とし、前収縮に対するパーセント変化として表示した。

## 2-5 使用薬物

ACh (Sigma-Aldrich)、IS (Sigma-Aldrich)、Phe (ナカライテスク株式会社) および SNP (Sigma-Aldrich) は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にて溶解した。BAY 41-2272 (Sigma-Aldrich) および forskolin (東京化成工業株式会社) は DMSO (ナカライテスク株式会社) を用いて溶解した。

## 2-6 統計学的処理

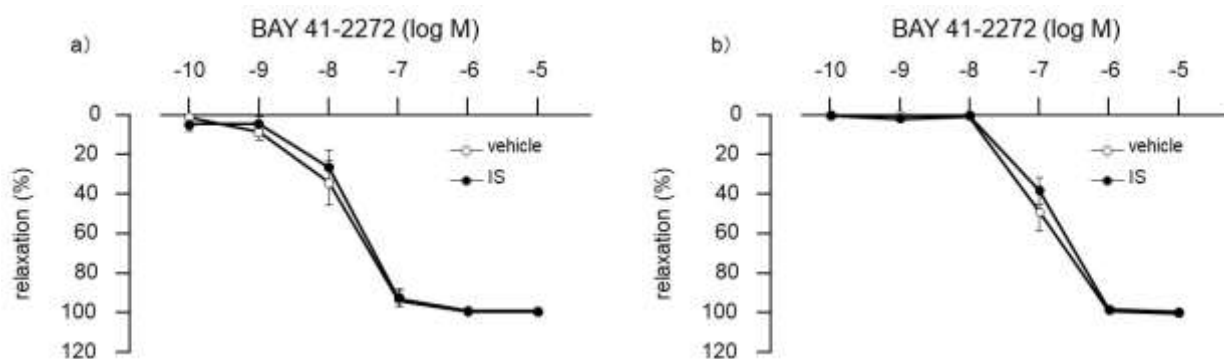
実験結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差検定は、Student の unpaired t 検定を用いた。検定において、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。

## 3. 実験結果

### 3-1 BAY 41-2272 誘発血管弛緩反応に対する IS 曝露の影響

IS 曝露時の sGC に対する影響を、BAY 41-2272 を用いて評価した。その結果、血管内皮非除去血管および除去血管のいずれにおいても、IS 曝露は BAY41-2272 誘発血管弛緩反応に対して何ら影響を与えなかった (Figure 7)。

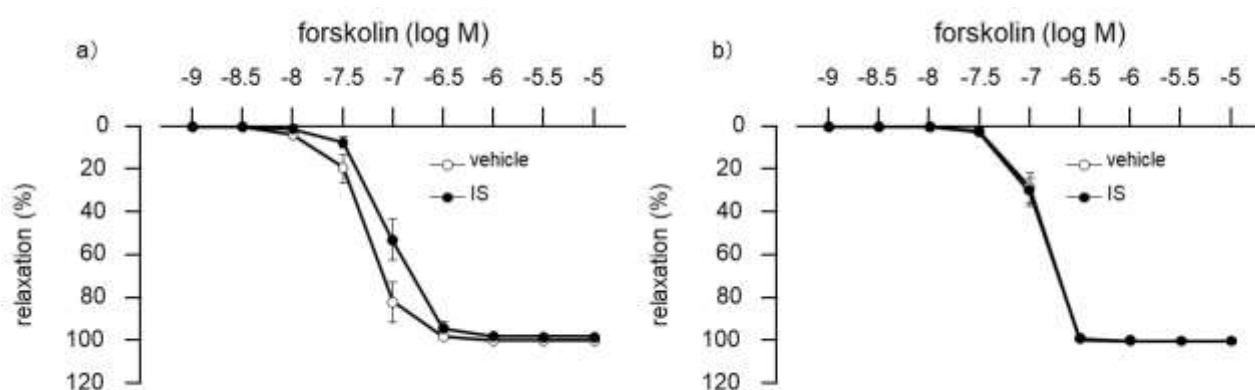




**Figure 7.** Influences of IS exposure on the BAY-41-2272-induced vasorelaxation response in (a) the endothelium-intact vascular rings and (b) the endothelium-denuded vascular rings. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. IS, indoxyl sulfate.

### 3-2 forskolin 誘発血管弛緩反応に対する IS 曝露の影響

AC 経路は NO/sGC 経路と同様に、血管弛緩反応を引き起こす重要なシグナル伝達経路であるため、IS 曝露が AC 活性化に伴う血管弛緩に及ぼす影響について検討した。内皮非除去血管を用いた検討では、IS 曝露により forskolin に対する血管反応性は統計学的に有意ではないものの、わずかに低下傾向を示した (Figure 8a)。一方、内皮除去血管においては、IS 曝露の影響は認められなかった (Figure 8b)。



**Figure 8.** Influences of IS exposure on the forskolin-induced vasorelaxation response in (a) the endothelium-intact vascular rings and (b) the endothelium-denuded vascular rings. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. IS, indoxyl sulfate.

#### 4. 考察

第一章において、摘出血管に対する IS 曝露は血管内皮および血管平滑筋における  $O_2^-$  産生を増大させることを明らかにした。また、CKD 患者や CKD モデル動物の血管組織では、過剰に ROS が産生されており、IS がこの産生亢進の要因の一つであることは多数報告されている<sup>29, 47)</sup>。しかしながらこれまでの研究において、IS による過剰な ROS 産生が、sGC の酸化還元状態に与える影響を及ぼすかについて検討した報告は皆無である。そこで本研究では、胸部大動脈に対する IS 曝露が sGC 機能 (sGC の酸化還元状態) に与える影響を検討した。その結果、血管内皮の有無に関わらず、IS は BAY 41-2272 誘発血管弛緩反応に何ら影響を及ぼさなかったことから、sGC 機能を変化させないと考えられる。また第 1 章で使用した NO 供与体 SNP は、薬物から放出された NO が還元型 sGC を刺激し cGMP を産生するが、本章で使用した BAY 41-2272 は NO 非依存的に還元型 sGC を直接刺激する。IS 曝露によって、前者の反応性は著明に低下したが、後者の反応性に大きな影響がみられていないことから、IS は sGC より上流に対し影響を及ぼす可能性が高い。つまり本章で紹介した結果は、第 1 章で詳述した、「IS は ROS 産生を介して、NO を捕捉し、血管弛緩反応の低下を引き起こす」という結論を強く支持する結果であると考えられる。

次に NO/sGC 経路以外の血管弛緩メカニズムに対する IS 曝露の影響を検討するために、AC を直接活性化する forskolin を用いて、AC 経路への影響を検討した<sup>48)</sup>。その結果、内皮非除去血管に対する IS 曝露は、forskolin 誘発血管弛緩反応をわずかに減弱させた。一方、内皮除去血管においては IS の影響はみられなかった。forskolin の AC 活性化作用に伴う血管弛緩反応は、主に 2 つのメカニズムにより引き起こされる。1 つは血管内皮における AC 活性化に次ぐ内皮型 NOS 活性亢進に伴う内皮依存的かつ NO 誘導性の血管弛緩であり、他方は血管平滑筋における AC 活性化による cAMP レベルの上昇を介した血管弛緩反応である<sup>49)</sup>。したがって、本実験でみられた内皮非除去血管における弛緩反応の減弱は、IS 曝露により産生された  $O_2^-$  が forskolin 刺激により生じる内皮由来の NO を捕捉・不活化したことに一部起因する可能性が考えられる。また、内皮除去血管を用いた結果より、IS 曝露は血管平滑筋の AC 経路を介した血管弛緩反応には影響を及ぼさないことが示された。

以上のことから、IS 曝露は、平滑筋における sGC 機能や AC 経路には何ら関与しないことが明

らかとなった。

## 小括

1. ラット胸部大動脈に対する IS 曝露は、血管内皮および血管平滑筋における  $O_2^-$  産生を増大させ、この増大が ACh および SNP による NO 依存性血管弛緩反応の減弱に大きく寄与することが示された。
2. IS 曝露による  $O_2^-$  産生増大のメカニズムの一つとして、血管内皮の AhR 刺激に伴う NADPH oxidase 活性亢進が密接に関与する可能性が示唆された。
3. IS 曝露は、平滑筋における sGC 機能や AC 経路に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

## 第2編 尿毒素キヌレニンのラット胸部大動脈に対する影響

### 第1章 ラット胸部大動脈に対するキヌレニン急性曝露が一酸化窒素を介した血管弛緩反応およびスーパーオキシド産生に与える影響

#### 1. 緒言

トリプトファン由来の代謝物は、典型的な尿毒素として作用する。トリプトファンは食事に含まれる必須アミノ酸の一つであり、主にセロトニン経路、インドール経路、キヌレニン(kynurenine:kyn)経路により代謝され、特に kyn 経路にて代謝される割合は 95%を占められている<sup>50)</sup>。kyn 経路では、律速酵素であるインドールアミン酸素添加酵素(indoleamine 2,3-dioxygenase:IDO)がトリプトファンと反応して N-formylkynurenine を生成し、さらに formidase と反応して kyn が生成される。IDO は体内に広く分布しており、感染や炎症により強く誘導され、トリプトファン代謝を顕著に亢進させる<sup>51-54)</sup>。また CKD 患者においては、IDO 活性の上昇が認められており<sup>55,56)</sup>、血中 kyn 濃度と CKD の病態進展の程度は正の相関があることも報告されている<sup>57,58)</sup>。一方、kyn は尿中への排泄あるいは kynureninase によって分解されることで血中濃度の上昇が抑制されているが、CKD 患者においては kynureninase の活性低下を伴うことが確認されている<sup>57)</sup>。したがって、CKD では kyn の尿中排泄低下と分解阻害の 2 つの要因により、kyn の体内蓄積が生じる可能性が十分に考えられる。

ESRD 患者の血漿中 kyn レベルと内皮機能障害マーカーである soluble intercellular adhesion molecule(sICAM-1)や von Willebrand factor(vWF)は正の相関を示すことから、kyn が血管系に対し毒性を示すことが示唆されている<sup>59,60)</sup>。また kyn は AhR に作用すること<sup>61)</sup>、さらには ROS 産生を亢進することも報告されているが<sup>62)</sup>、胸部大動脈における kyn の血管機能および ROS 産生に及ぼす直接的な影響については不明な点が数多く残されている。さらに kyn の病態生理学的役割に関しては、培養細胞を用いた検討により得られた知見が主体であることから、kyn の血管組織に対する影響を検討することは、血管生理学の観点からも非常に重要であると考えられる。これらのことから本研究では、第1編と同様に、大血管の主要な血管弛緩メカニズムである NO/sGC 経路および AC 経路に対する kyn の影響について検討した。

## 2. 方法

### 2-1 実験動物

実験動物として、8～10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは一定の照明(明期 12 時間)、恒温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )、恒湿( $55 \pm 5\%$ )の条件下で飼育した。

### 2-2 大動脈リング標本の作製

8～10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットより第 1 編第 1 章 2-2 項に記述した方法に準じて大動脈リング標本を作製し、実験は第 1 編第 1 章 2-2 項と同様の条件にて行った。

### 2-3 大動脈リング標本における各種血管作動性物質の反応

マグヌス管内にリング標本を懸垂後、60 分間安定化させ、その間 15 分ごとに緩衝液を交換した。Kyn 曝露の実験開始前に、Phe( $10^{-6}$  M)を添加して血管を収縮させた。次いで ACh( $10^{-6}$  M)を添加し、Phe の収縮に対して 80%以上の弛緩反応を認めることで、内皮細胞の存在を確認した。内皮除去標本においては、ACh( $10^{-6}$  M)添加による弛緩反応を認めず、また SNP( $10^{-6}$  M)が弛緩反応を示すことで血管内皮の除去を確認した。その後、血管を洗浄し、30 分以上の安定放置を行なった。次いで、kyn(10、100 および 500  $\mu\text{M}$ )をマグヌス管内に添加し、30 分または 2 時間放置した。その後、Phe により血管を前収縮させた。Phe による前収縮が安定した後、ACh( $10^{-9}$  ～  $10^{-5}$  M)、SNP( $10^{-9}$  ～  $10^{-5}$  M)、sGC 刺激薬 BAY 41-2272( $10^{-10}$  ～  $10^{-5}$  M)および AC 活性化薬 forskolin( $10^{-9}$  ～  $10^{-5}$  M)を累積的に添加し、血管機能を評価した。なお、血管弛緩反応は各標本の Phe による前収縮を 100%とし、前収縮に対するパーセント変化として表示した。また、kyn による血管機能障害のメカニズムを調べる検討においては、kyn 添加 30 分前に apocynin(100  $\mu\text{M}$ )、ascorbic acid(100  $\mu\text{M}$ )および CH223191(10  $\mu\text{M}$ )をそれぞれ添加した。

### 2-4 胸部大動脈における $\text{O}_2^-$ 産生量の測定

大動脈における  $\text{O}_2^-$  産生は  $\text{O}_2^-$  と特異的に反応する lucigenin を用いた化学発光法により測定した。なお実験手順は第 1 編第 1 章 2-4 項と同様である。すなわち、大動脈リング標本を、95%  $\text{O}_2$  -5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを通気した Krebs-HEPES 緩衝液(pH 7.4、 $37^\circ\text{C}$ )が充填されたテストチューブに

入れ、kyn 100  $\mu$ M を緩衝液中に添加し 2 時間放置した。さらに阻害薬の影響を調べる実験では、kyn を添加する 30 分前に、2-3 項と同様の阻害薬を処置した。その後、ルミノメーター (Lumat 3, BELTHOLD TECHNOLOGIES) 中にて lucigenin (5  $\mu$ M) を添加し、lucigenin と  $O_2^-$  の反応により生じた光子を計測した。血管非存在下における発光をバックグラウンドとして血管存在下における計測値から差し引いた。ルミノメーターの計測値は RLU として表示され、乾燥血管重量 1 mg あたり、計測時間 1 分あたりの RLU を血管からの  $O_2^-$  産生量とした。

## 2-5 使用薬物

ACh (Sigma-Aldrich)、ascorbic acid (富士フィルム和光純薬株式会社)、kyn (東京化成工業株式会社)、Phe (ナカライテスク株式会社) および SNP (Sigma-Aldrich) は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にて溶解した。Apocynin (東京化成工業株式会社)、BAY 41-2272 (Sigma-Aldrich)、CH223191 (Cayman Chemical 社) および forskolin (東京化成工業株式会社) は DMSO (ナカライテスク株式会社) を用いて溶解した。Lucigenin (ナカライテスク株式会社) は超純水にて溶解した。

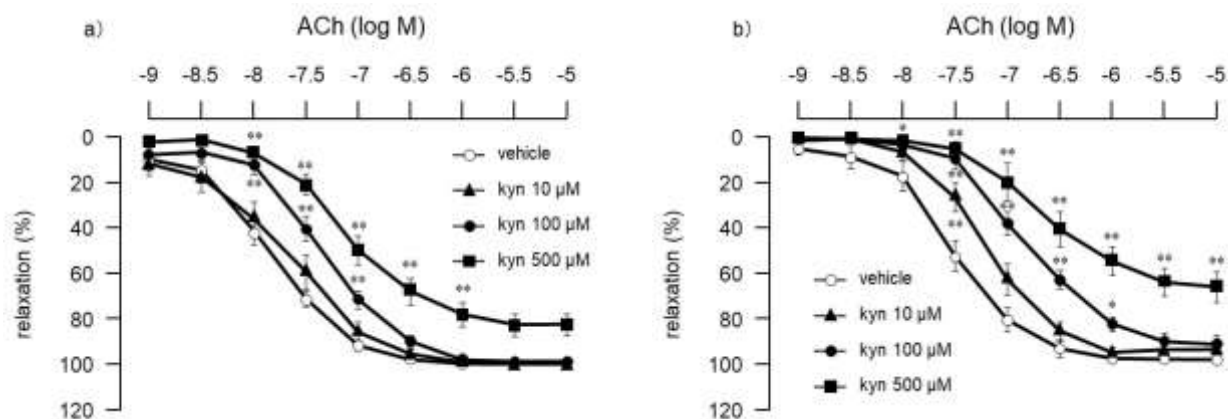
## 2-6 統計学的処理

実験結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較の場合 Student の unpaired t 検定を用いた。また、3 群以上の有意差検定は多重比較検定を用いた。すなわち、一元配置分散分析 (one-way ANOVA test) を行い、有意差が認められた場合、Dunnnett's test を用いて検定を行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。

## 3. 実験結果

### 3-1 ACh 誘発血管弛緩反応に対する kyn 曝露の影響

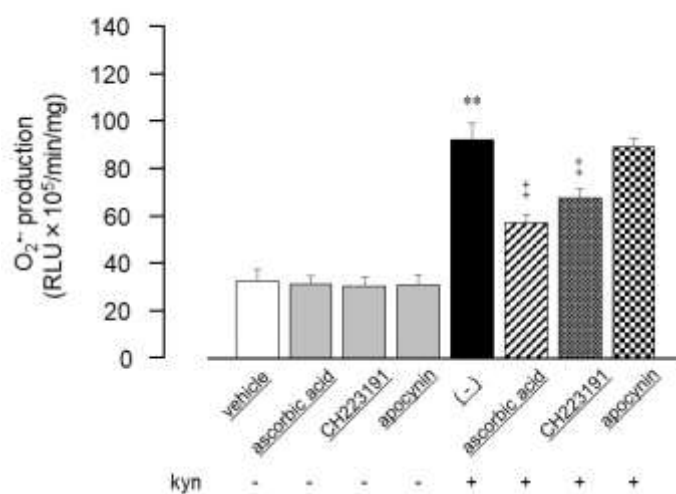
30 分間の kyn 曝露は、kyn の濃度依存的に ACh に対する血管反応性を減弱させた (Figure 9a)。また、2 時間の kyn 曝露においても濃度依存的な ACh 誘発血管弛緩反応の低下が観察され、その作用は曝露時間 30 分と比較してより強いものであった (Figure 9b)。これらの結果に基づき、これ以降の検討においては、kyn 100  $\mu$ M、2 時間曝露を実験条件として設定した。



**Figure 9.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-intact aorta on vasorelaxant response to ACh. Incubation with kyn for (a) 30 min and (b) 2 h. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-8 experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle. ACh, acetylcholine; kyn, kynurenine.

### 3-2 内皮非除去血管に対する kyn 曝露が $O_2^-$ 産生に及ぼす影響

ラット胸部大動脈における  $O_2^-$  産生は、kyn 曝露により顕著に増加した。またその増加は、ascorbic acid および CH223191 の前処置によって有意に抑制されたが、apocynin は何ら影響を及ぼさなかった。なお、kyn 非曝露時における各薬物の単独処置は、大動脈の  $O_2^-$  産生に対して影響を与えなかった (Figure 10)。



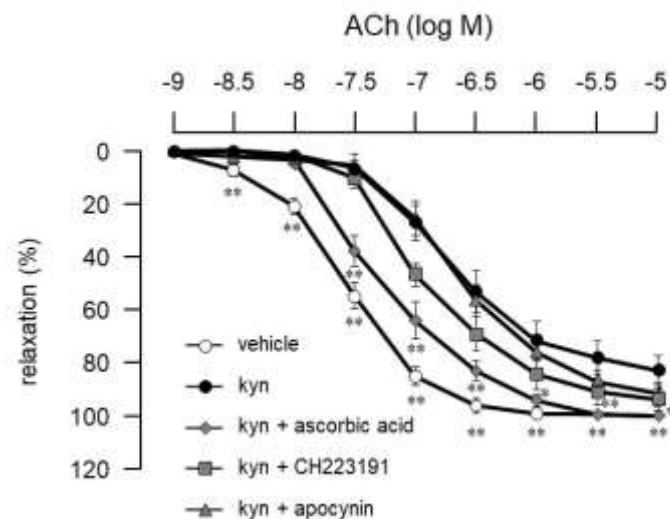
**Figure 10.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-intact aorta on  $O_2^-$  production. Each column and



bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 experiments. \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle and ‡  $P < 0.01$ , compared with kyn. RLU, relative light units;  $O_2^-$ , superoxide anion; kyn, kynurenine.

### 3-3 内皮非除去血管の kyn 曝露により生じる ACh 誘発血管弛緩反応低下に対する各種阻害薬の影響

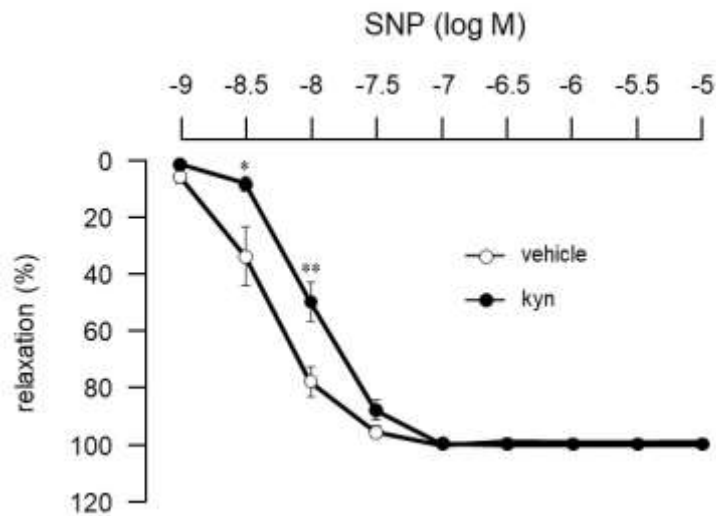
Figure 11 に示すように、kyn 曝露により生じる ACh 誘発血管弛緩反応の減弱は、ascorbic acid 前処置により顕著に改善された。また、CH223191 前処置は、統計学的に有意ではないものの、改善傾向を示したが、apocynin 前処置は何ら影響を及ぼさなかった。



**Figure 11.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-intact aorta on vasorelaxant response to ACh in the presence of ascorbic acid, CH223191 and apocynin. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-8 experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , compared with kyn. ACh, acetylcholine; kyn, kynurenine.

### 3-4 SNP 誘発血管弛緩反応に対する kyn 曝露の影響

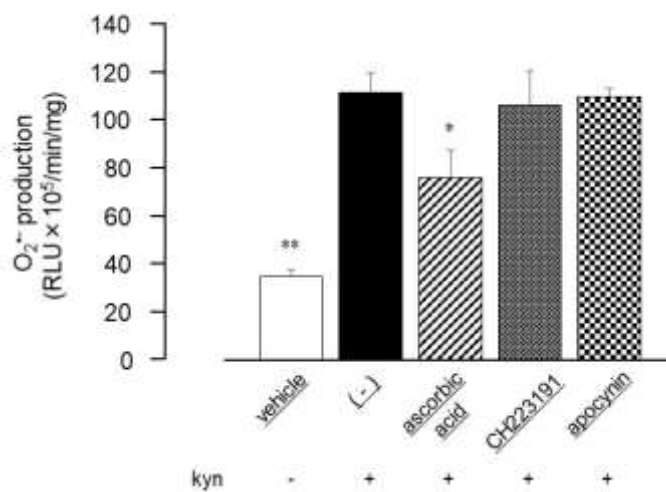
Kyn の血管平滑筋に対する影響を評価するために、内皮非依存性かつ NO 誘発血管弛緩に対する影響を検討した。内皮除去血管に対する kyn 曝露は、SNP による血管弛緩反応を有意に減弱させた (Figure 12)。



**Figure 12.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-denuded aorta on vasorelaxant response to SNP. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle. SNP, sodium nitroprusside; kyn, kynurenine.

### 3-5 内皮除去血管に対する kyn 曝露が $O_2^-$ 産生に及ぼす影響

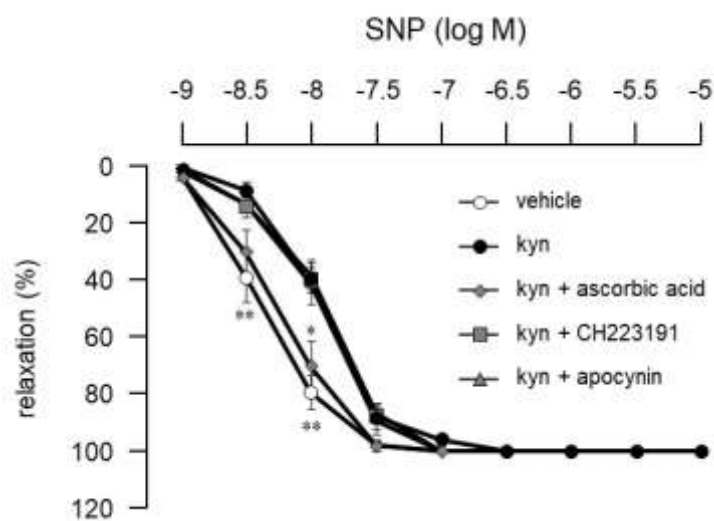
内皮除去血管における  $O_2^-$  産生量は、kyn 曝露により有意に増加したが、この増加は ascorbic acid 前処置によってのみ有意に抑制され、apocynin および CH223191 は何ら影響を及ぼさなかった (Figure 13)。



**Figure 13.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-denuded aorta on  $O_2^-$  production. Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , compared with kyn. RLU, relative light units;  $O_2^-$ , superoxide anion; kyn, kynurenine.

### 3-6 内皮除去血管の kyn 曝露により生じる SNP 誘発血管弛緩反応低下に対する各種阻害薬の影響

Kyn 曝露により生じる SNP 誘発血管弛緩反応の低下に対する各薬物の影響について検討したところ、ascorbic acid 前処置は kyn 曝露後の SNP に対する血管反応性の低下を有意に改善した。しかしながら、apocynin および CH223191 の前処置には改善効果が認められなかった (Figure 14)。

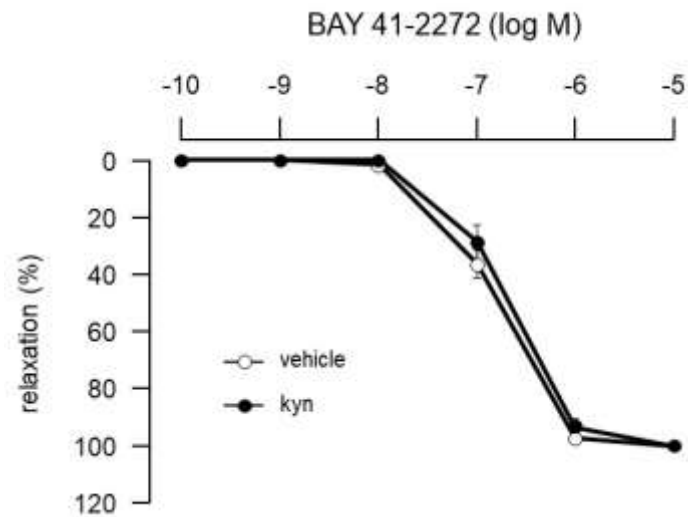


**Figure 14.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-denuded aorta on vasorelaxant response to SNP in the presence of ascorbic acid, CH223191 and apocynin. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ , compared with kyn. SNP, sodium nitroprusside; kyn, kynurenine.

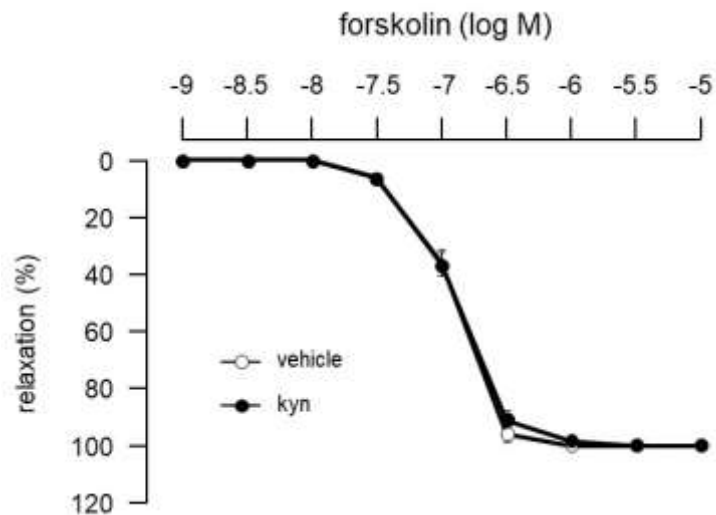
### 3-7 BAY 41-2272 および forskolin 誘発血管弛緩反応に対する kyn 曝露の影響

sGC 刺激薬 BAY 41-2272 および AC 活性化薬 forskolin を用いて、内皮除去血管における sGC 経路あるいは AC 経路を介した血管弛緩反応に対する kyn 曝露の影響について検討した。

その結果、いずれの血管弛緩薬による反応においても、vehicle と比較して kyn 曝露による明らかな影響は認められなかった (Figure 15、16)。



**Figure 15.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-denuded aorta on vasorelaxant response to BAY 41-2272. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 experiments. kyn, kynurenine.



**Figure 16.** Influences of acute exposure to kyn in the endothelium-denuded aorta on vasorelaxant response to forskolin. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-8 experiments. kyn, kynurenine.

#### 4. 考察

酸化ストレスマーカーの一種である Cu/Zn superoxide dismutase は、血漿 kyn レベルと正の相関を示すことが報告されている<sup>63)</sup>。そこで本研究では、内皮非除去血管に対して kyn 曝露を行い、 $O_2^-$  産生量を測定した。その結果、胸部大動脈における  $O_2^-$  産生は kyn 曝露により増大し、この増大は ascorbic acid 前処置によって有意に抑制されるとともに、kyn 曝露による ACh に対する血管反応性の低下も顕著に改善された。したがって、kyn 曝露により生じる ACh 誘発血管弛緩反応の低下は、 $O_2^-$  の過剰産生に起因していることが示された。

natural killer(NK)細胞を用いた実験において、kyn は ROS 産生を著明に亢進させ、NK 細胞のアポトーシスを誘導することが見出されている<sup>62)</sup>。また同時に、apocynin 処置による ROS 産生の低下に伴い、アポトーシスが抑制されたことも明らかにされている<sup>62)</sup>。さらに、細胞質受容体である AhR の活性化は NADPH oxidase の活性化に密接に関与しており<sup>37)</sup>、kyn は AhR のリガンドであることも報告されている<sup>61)</sup>。そこで次に、内皮非除去血管における  $O_2^-$  産生の増加が、AhR と NADPH oxidase の活性化亢進に基づくか否かについて検討した。その結果、CH223191 の前処置は、kyn 誘発  $O_2^-$  産生の増加を有意に抑制し、ACh に対する血管反応性も改善傾向を示した。すなわち、内皮非除去血管においては kyn が AhR に結合し、 $O_2^-$  産生を促進している可能性が示唆された。一方、apocynin の前処置は kyn 曝露による  $O_2^-$  産生と ACh に対する血管反応性低下に対して明らかな影響を及ぼさなかったことから、kyn 曝露による  $O_2^-$  産生増大には NADPH oxidase 活性化を伴わないことが推察される。なお、本実験で用いた apocynin の処置濃度および処置時間は、NADPH oxidase を阻害するには十分であることが既報により明らかにされている<sup>64)</sup>。また血管内皮細胞を AhR 刺激薬で処置した実験結果から、AhR 活性化による ROS 産生のメカニズムには、CYP1A1 の活性化が一部関与していることが報告されており<sup>65)</sup>、肝組織内の kyn レベルが上昇した急性肝障害モデルマウスにおいても、肝組織における CYP1A1 mRNA 発現量の顕著な増加が確認されている<sup>66)</sup>。さらに、HepG2 細胞に対する kyn 処置は、CYP1A1 タンパク発現を増加させ、CH223191 によりその増加が消失することも示されている<sup>67)</sup>。これらのことから、本研究でみられた kyn 曝露による  $O_2^-$  産生の増大にも AhR を介した CYP1A1 活性化が関与する可能性は否定できず、詳細なメカニズムについては今後さらなる検討が必要と考えられる。

次に kyn 曝露の血管平滑筋に対する影響に関して内皮除去血管を用いて検討したところ、kyn

は SNP による血管弛緩反応を有意に低下させた。また、kyn の  $O_2^-$  産生増大作用は内皮除去血管においても観察された。このことから、kyn は血管平滑筋においても  $O_2^-$  の過剰な産生を引き起こし、NO を介した血管弛緩反応を減弱させることが明らかとなった。ヒト大動脈血管平滑筋初代細胞を用いた *in vitro* 試験において、kyn は濃度依存的に AhR 活性を上昇させ、この上昇は CH223191 前処置により抑制されることが明らかにされている<sup>61)</sup>。そこで、本研究においても内皮除去血管に対する CH223191 の影響を評価したが、kyn 曝露による  $O_2^-$  産生並びに SNP に対する血管反応性低下に明らかな変化は認められなかった。したがって、血管平滑筋に発現する AhR は、kyn 曝露後の  $O_2^-$  産生には関与しないことが示唆される。また骨格筋を使用した実験において、kyn は AhR の活性化とは無関係に ROS 産生を促進することが確認されており、血管平滑筋においても同様の経路を介する可能性は考えられる<sup>68)</sup>。

Kyn 曝露は ACh や SNP の NO 誘導性血管弛緩反応を有意に低下させたため、次に sGC 機能に対する kyn 曝露の影響を検討した。その結果、kyn 曝露は BAY 41-2272 誘発血管弛緩反応に対して何ら影響を及ぼさなかった。したがって、kyn 曝露によって生じた  $O_2^-$  は、sGC の酸化還元状態に影響を与えることなく、主に NO を捕捉することで血管弛緩反応の低下に寄与していると考えられる。

さらに NO/sGC 経路以外の血管弛緩反応に対する kyn の影響について検討したところ、kyn 曝露は内皮除去血管における forskolin 誘発血管弛緩反応に何ら影響を及ぼさなかった。このことから、kyn は、AC 経路を介した血管弛緩反応には影響を与えないことも明らかとなった。

### 第3編 虚血性急性腎障害に伴う血管内皮機能障害に対するインドキシル硫酸の寄与

#### 第1章 腎虚血再灌流後の腎機能および血管内皮機能の経時的変化に関する検討

##### 1. 緒言

腎虚血再灌流は急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) の原因の一つであり、入院患者においては高い罹患率と死亡率を示している<sup>69)</sup>。加えて、CKD への移行率も高いことから、AKI から CKD への移行メカニズムに関する研究は幅広く行われている<sup>70, 71)</sup>。しかしながらこれまでのところ、その詳細なメカニズムは十分に解明されておらず、現段階において有効な予防手段は確立されていない。

血管内皮機能の低下は、腎障害および心血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) の発症に繋がることは周知の事実である<sup>72)</sup>。またこれとは逆に、血管内皮機能障害は AKI によって引き起こされることも知られている<sup>73, 74)</sup>。AKI は ROS の過剰産生を伴うことが報告されており<sup>75)</sup>、この ROS 産生の増大に伴う NO や内皮由来過分極因子などの内皮由来弛緩因子の不活性化と減少が原因となって、血管内皮機能障害を引き起こすと考えられている<sup>76)</sup>。中でも注目すべきは、AKI に伴う血管内皮機能障害は、原発巣 (すなわち腎臓) だけではなく<sup>73)</sup>、遠隔部位においても惹起され<sup>74)</sup>、多臓器障害への連鎖を生じさせると考えられている。このことから、AKI 発症後の血管内皮機能障害が、その後の CKD への進行に寄与している可能性は極めて高い。しかしながら、AKI 発症後における血管内皮機能の経時的変化に関しては、未解明のままである。

本章では、虚血性 AKI モデルラットを作製し、腎障害発症後の腎機能並びに血管内皮機能の推移について検討した。

##### 2. 方法

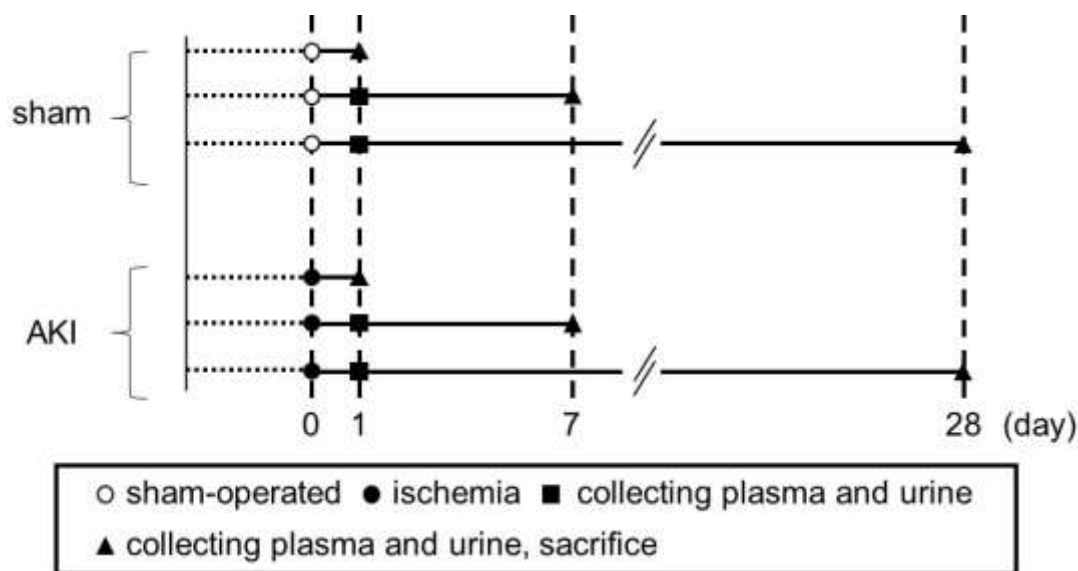
###### 2-1 実験動物

実験動物として、8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは一定の照明 (明期 12 時間)、恒温 ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )、恒湿 ( $55 \pm 5\%$ ) の条件下で飼育した。

###### 2-2 虚血性急性腎障害モデルラットの作製

麻酔下のラットの右側腹部切開を施し、右腎を露出させて右腎動静脈並びに輸尿管を結紮した。次いで、右腎を摘出し、切開部を縫合した。2 週間後、麻酔下において左側腹部切開を施して左腎を露出し、腎動静脈周囲の脂肪を注意深く除去した。次いで、非外傷性クリップを用いて左腎動静脈の血流を遮断し、腎臓を阻血状態にした。45 分後にクリップを除去し、血流を再開させた。その後、腎臓を腹腔内に戻し切開部を縫合した。なお、腎虚血再灌流処置を除く同様の操作を行ったものを sham ラットとして比較対照に用いた。

全てのラットは再灌流 1、7 および 28 日後に代謝ケージに入れ、5 時間の採尿を行った。採尿後、麻酔下において、heparin (1000 U/kg, i.v.) を頸静脈へ投与し、腹部大動脈から採血を行った。採取した血液および尿を用いて、腎機能パラメーターの測定を行った。また、胸部大動脈を摘出し大動脈リング標本を作製し、血管機能を評価するとともに、ROS 産生量を測定した。なお、再灌流 7 および 28 日後に血管機能を測定したラットにおいては、再灌流後 1 日目に頸静脈から採血を行い、腎機能の低下を確認することで、AKI の発症を確認した。また、sham 群においても同様の操作を行った (Figure 17)。



**Figure 17.** Schematic diagram depicting the experimental protocols. AKI, acute kidney injury.

### 2-3 腎機能パラメーターの測定

血漿クレアチニン (plasma creatinine: Pcr)、尿中クレアチニン (urine creatinine: Ucr) は Jaffe's 法



により測定した。血漿および 11 倍希釈尿に、除タンパク試薬を加え沈澱させた後、上清を分離した。この上清に NaOH およびピクリン酸を加え、27.5℃の水浴中で 20 分間放置した。生じた橙赤色縮合物の吸光度を 520 nm の波長で測定した。標準液から得られた検量線より、Pcr および Ucr をそれぞれ求め、これらと尿量および体重よりクレアチニンクリアランス(creatinine clearance:Ccr)を算出した。

#### 2-4 大動脈リング標本の作製および各種血管作動性物質の反応

大動脈リング標本の作製は、第 1 編第 1 章 2-2 項に記述した方法に準じて行った。マグヌス管内にリング標本を懸垂後、60 分間安定化させ、その間 15 分ごとに緩衝液を交換した。すべての大動脈リング標本は Phe ( $10^{-6}$  M) による前収縮が安定した後、ACh ( $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$  M) および SNP ( $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$  M) を累積的に添加することで、血管機能を評価した。なお、血管弛緩反応は各標本の Phe による前収縮を 100% とし、前収縮に対するパーセント変化として表示した。

#### 2-5 胸部大動脈における $O_2^-$ 産生量の測定

再灌流 28 日後の胸部大動脈中  $O_2^-$  産生量は、 $O_2^-$  と特異的に反応する lucigenin を用いた化学発光法により測定した。大動脈リング標本は第 1 編第 1 章 2-2 項と同様の方法で準備し、第 1 編第 1 章 2-4 項と同様の方法で  $O_2^-$  産生量を測定した。

#### 2-6 使用薬物

ACh (Sigma-Aldrich)、Phe (ナカライテスク株式会社) および SNP (Sigma-Aldrich) は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にて溶解した。Lucigenin (ナカライテスク株式会社) は超純水にて溶解した。

#### 2-7 統計学的処理

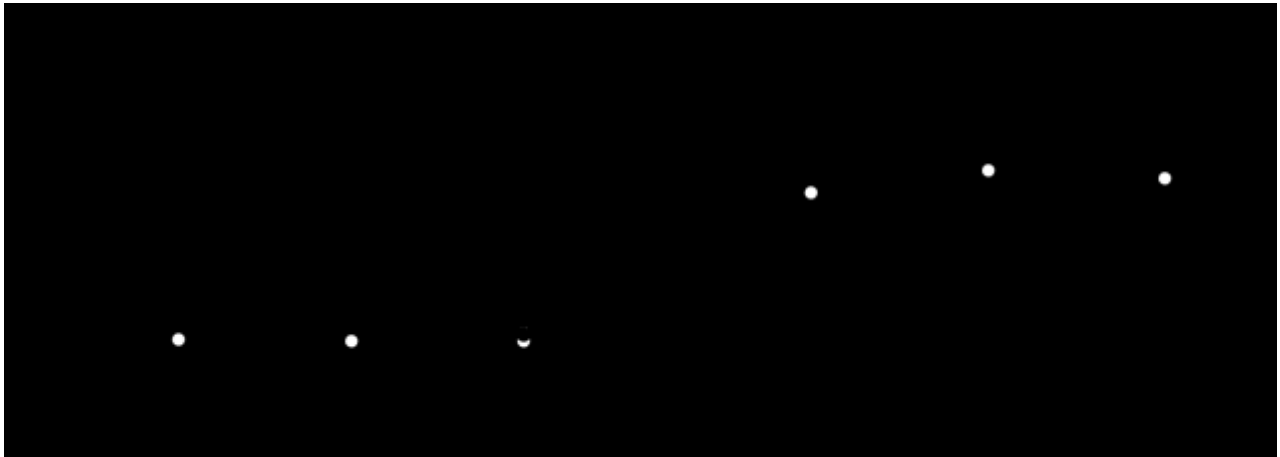
実験結果は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較の場合 Student の unpaired t 検定を用いた。また、3 群以上の有意差検定は多重比較検定を用いた。すなわち、一元配置分散分析 (one-way ANOVA test) を行い、有意差が認められた場合、Dunnett's test を用いて検定を

行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。

### 3. 実験結果

#### 3-1 虚血再灌流後の腎機能推移

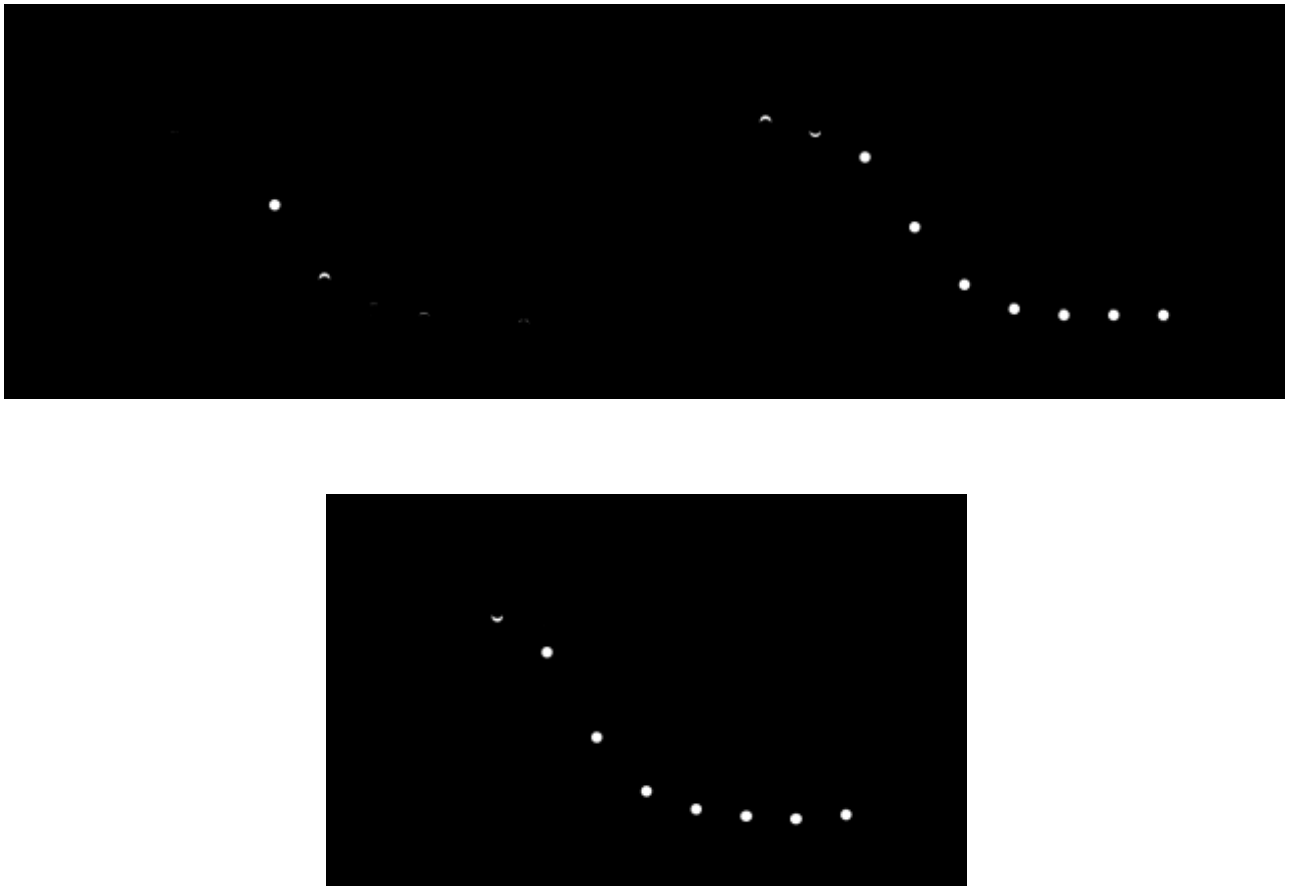
虚血再灌流処置により、再灌流 1 日後に Pcr の有意な増加 (Figure 18a) と、Ccr の低下 (Figure 18b) がみられ、腎機能の悪化を認めた。その後、腎機能の低下は経時的に改善し、再灌流 28 日後においては sham 群と同程度まで回復した。



**Figure 18.** Changes in renal function (a: plasma creatinine, b: creatinine clearance) after renal ischemia/reperfusion. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham-1 day, n=5; sham-7 day, n=5; sham-28 day, n=6; AKI-1 day, n=8; AKI-7 day, n=10; AKI-28 day, n=8. \*\* $P < 0.01$ , compared with sham. AKI, acute kidney injury.

#### 3-2 再灌流 1、7 および 28 日後の胸部大動脈の ACh に対する血管反応性

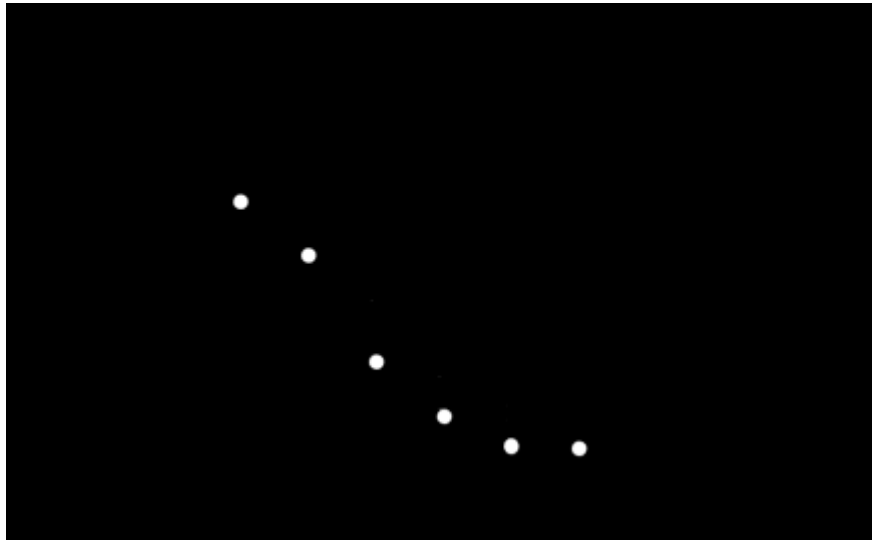
Figure 19a に示すように、再灌流 1 日後の胸部大動脈の ACh に対する血管反応性は、sham 群と AKI 群の 2 群間において、大きな差はみられなかった。一方、再灌流 7 および 28 日後では、AKI 群の ACh に対する血管反応性は sham 群と比較し有意に低下した (Figure 19b、19c)。特に再灌流 28 日後においては、より顕著な血管反応性の減弱が観察された。



**Figure 19.** Vascular reactivity to ACh in the thoracic aorta (a) 1 day, (b) 7 days, and (c) 28 days after reperfusion. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham-1 day, n=5; sham-7 day, n=5; sham-28 day, n=6; AKI-1 day, n=8; AKI-7 day, n=10; AKI-28 day, n=8. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01, compared with sham. AKI, acute kidney injury.

### 3-3 再灌流 28 日後の胸部大動脈の SNP に対する血管反応性

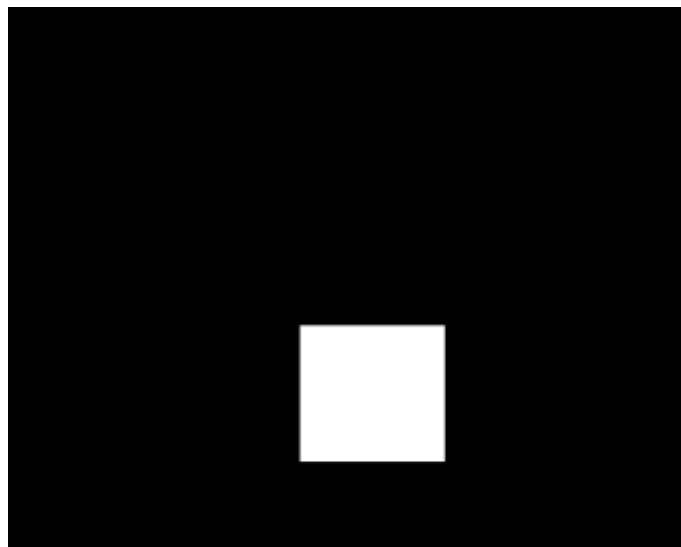
再灌流 28 日後の内皮非依存性血管弛緩反応に関して SNP を用いて評価したところ、虚血再灌流処置は SNP に対する血管反応性を有意に低下させた (Figure 20)。



**Figure 20.** Vascular reactivity to SNP in the thoracic aorta 28 days after reperfusion. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=6; AKI, n=8. \*\*P<0.01, compared with sham. AKI, acute kidney injury.

### 3-4 再灌流 28 日後の胸部大動脈における $O_2^-$ 産生量

再灌流 28 日後の血管組織中  $O_2^-$  産生量を測定したところ、sham 群と比較し AKI 群においては、明らかな  $O_2^-$  産生の増加が認められた (Figure 21)。



**Figure 21.**  $O_2^-$  production in the thoracic aorta 28 days after reperfusion. Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=6; AKI, n=8. \*\*P<0.01, compared with sham. AKI, acute kidney injury; RLU, relative light units;  $O_2^-$ , superoxide anion.

#### 4. 考察

AKI は、一時的あるいは長期的な尿毒素の蓄積、電解質の不均衡、過剰な体液貯留などをもたらし、その結果腎臓だけでなく脳、肺、心臓および肝臓などとの異常な臓器間コミュニケーションによる遠隔臓器障害を引き起こすことが広く知られている<sup>16-19)</sup>。特に、腎臓と心臓のクロストークは、心腎連関として注目されており、数多くの研究が行われている。心腎連関の一例として、AKI 発症後に心不全や心筋梗塞などの CVD の発症率が増大することは、疫学研究によって示されている<sup>77)</sup>。さらに、腎障害に併発する血管内皮機能障害は、アルブミン尿や腎障害進展の危険因子であると同時に、CVD の発症および進展に関与する<sup>78)</sup>。そこで本研究では、AKI 発症後において、大血管である胸部大動脈血管内皮機能を経時的に評価した。

本章で得られた知見のうち最も重要なことは、虚血再灌流処置により腎機能が顕著に低下した時点においては胸部大動脈の血管内皮機能が正常ではあるものの、その後の腎機能の回復とは相反して内皮機能障害は進行していたことである。一般的に、虚血性 AKI モデルにおける腎機能の変化は、再灌流直後に著明に悪化し、その後時間の経過とともに回復することが明らかにされている<sup>79)</sup>。本研究における虚血性 AKI モデルラットも、同様の腎機能推移を示した。また AKI と血管機能障害の関係については、腎動脈および腎臓から遠位の血管において多数報告されている。例えば、AKI 発症後の腎動脈は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進による ROS の過剰生成と、それに引き続く NO の不活化、加えてアデノシン、エンドセリン、プロスタグランジンによる過剰な血管収縮が引き起こされることが確認されている<sup>80)</sup>。さらに、60 分間の両側腎虚血を行ったラットの腎弓状動脈は、再灌流 1 時間後の時点において、ACh に対する血管反応性が著しく低下することも明らかにされている<sup>81)</sup>。今回評価した腎臓から遠位の血管である胸部大動脈に関しては、腎虚血 60 分処置(本研究は 45 分)を行った虚血性 AKI モデルにおいて、再灌流後 5 日目に ACh に対する反応性は有意に低下し、SNP 誘発血管弛緩反応もわずかに減弱することが報告されている<sup>82)</sup>。これらのことから、AKI の原発部位である腎臓では、再灌流後早期に血管内皮機能障害が発生し、一方遠隔の血管である胸部大動脈においては、原発部位より発

症時期は遅れるが、同様に血管内皮機能障害が発生する可能性が極めて高いと考えられる。

$O_2^-$  などの ROS は、疾患の発症や進行に密接に関与している<sup>83)</sup>。腎虚血再灌流後の  $O_2^-$  の過剰産生は、腎臓だけではなく、遠隔の血管においても生じることが報告されている。その一例として、AKI 発症 5 週間後の時点において、薄筋動脈では  $O_2^-$  産生の過剰な増大が確認され、その増大は apocynin 投与により正常化される<sup>84)</sup>。これは、AKI 発症後、腎機能が回復しているにもかかわらず、腎臓から遠隔の血管において  $O_2^-$  産生が増加した本研究結果を強く支持するものである。よって、AKI 後に生じる遠隔血管の血管内皮機能の破綻には、その血管組織における過剰な  $O_2^-$  産生が関与していると考えられる。本研究においては、ACh に対する血管反応性の低下のみならず、再灌流 28 日後において SNP 誘発血管弛緩反応の減弱が観察された。すなわち、胸部大動脈において過剰に産生された  $O_2^-$  が、ACh および SNP 由来の NO を捕捉することにより、それぞれの血管弛緩薬に対する血管反応性を低下させている可能性が示唆された。

本研究の第 1 編では、ラット胸部大動脈に対する IS の急性曝露は、NO を介する血管弛緩反応を顕著に障害することを明らかにした。また、本実験で使用した虚血性 AKI モデルラットにおいては、腎機能の低下に伴って血中 IS 濃度が上昇することも既に報じられている<sup>85)</sup>。このことから、第 2 章では、虚血性 AKI に伴う血管内皮機能の低下における IS の関与について検討を加えた。

### 第3編 虚血性急性腎障害に伴う血管内皮機能障害に対するインドキシル硫酸の寄与

## 第2章 腎虚血再灌流に伴う血管内皮機能障害に対する再灌流直後の球形吸着炭 AST-120 投与の影響

### 1. 緒言

近年、心腎連関の主要な原因の一つとして、尿毒素の関与が多数報告されている<sup>86, 87)</sup>。第1編では、尿毒素の一種である IS が胸部大動脈における  $O_2^-$  産生を亢進させ、この  $O_2^-$  による NO の捕捉が ACh および SNP 誘発血管弛緩反応の低下に関与することを示した。一方、IS の前駆体を腸内にて吸着する AST-120 を CKD モデルラットに投与したところ、血中 IS 濃度の低下に伴って、ACh 誘発血管弛緩反応の減弱は改善されることが明らかにされている<sup>88)</sup>。またその改善メカニズムには、IS 濃度の低下による NADPH oxidase 活性の抑制と、ROS と NO の反応により生じるニトロチロシンの産生抑制が関与すると報告されている<sup>88)</sup>。すなわち、CKD モデルラットにおいては IS による NADPH oxidase 活性の上昇が、ROS 産生の亢進と ROS による NO の捕捉を引き起こしている可能性が極めて高い。したがって、腎障害に起因する血管内皮機能障害に IS が密接に関与していることは明らかである。

AKI においても、腎機能の低下に伴って血中 IS 濃度は上昇し、IS の蓄積に起因する腎障害の進行が確認されている<sup>85)</sup>。しかしながら、IS が AKI 後に生じる血管内皮機能障害に、どの程度関与しているかは解明されていない。そこで本章では、虚血性 AKI 後の血管内皮機能障害における IS の関与を、球形吸着炭 AST-120 投与により検証した。

### 2. 方法

#### 2-1 実験動物

実験動物として、8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは一定の照明(明期 12 時間)、恒温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )、恒湿( $55 \pm 5\%$ )の条件下で飼育した。

#### 2-2 虚血性急性腎障害モデルラットの作製

第3編第1章 2-2 項に記述した方法に準じて、虚血性 AKI モデルラットを作製した。AKI+AST-

120 群には、AST-120 (2.5 g/kg, p.o.) を再灌流 3、6 および 24 時間後に合計 3 回投与し、sham 群および AKI 群には溶媒であるカルボキシメチルセルロースを投与した。全てのラットは再灌流 1、7 および 28 日後に代謝ケージに入れ、5 時間の採尿後、頸静脈より採血を行なった (Figure 22)。



**Figure 22.** Schematic diagram depicting the experimental protocols. AKI, acute kidney injury.

### 2-3 腎機能パラメーターの測定

Pcr、Ucr 並びに Ccr は第 3 編第 1 章 2-3 項に記述した方法に準じて測定した。

### 2-4 大動脈リング標本における各種血管作動性物質の反応

ラット胸部大動脈リング標本の作製並びにマグヌス法を使用した血管機能の測定は、第 3 編第 1 章 2-4 項に記述した方法に準じて行った。

### 2-5 胸部大動脈における $O_2^-$ 産生量の測定

第 1 編第 1 章 2-4 項に記述した方法に準じて、再灌流 28 日後の胸部大動脈中の  $O_2^-$  産生量を、 $O_2^-$  と特異的に反応する lucigenin を用いた化学発光法により測定した。

### 2-6 血漿および尿中 IS 濃度の測定

血漿および尿中の IS 濃度は、既報の通り、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ー蛍光光度法を用いて測定した<sup>89)</sup>。超純水で希釈した血漿および尿 125  $\mu$ L を、内標準物質 *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルを含むアセトニトリルに加え、10000 rpm、4°C にて 15 分間遠心分離を行った。その後、



得られた上清をフィルター濾過し、分析に供した。HPLC システムは、液体クロマトグラムポンプ (L-2130; Hitachi)、蛍光検出器 (L-2485; Hitachi) で構成され、固定相には A COSMOSIL PBr Packed Column 4.6 mm I.D.\*250 mm (ナカライテスク株式会社) を、移動相には 0.02 M 酢酸バッファー (pH 4.5)/アセトニトリル (1 mL/min) を使用した。また、蛍光検出器の励起/蛍光波長は 280/375 nm に設定し、分析した。なお、IS の標準液を用いて検量線を作成し、絶対検量線法を用いて各サンプル中の IS 濃度を測定した。

## 2-7 病理組織学的評価

再灌流 28 日後における胸部大動脈の病理学的検討を行うため、各群より摘出した胸部大動脈の周囲の脂肪組織を除去後、10%ホルマリンを含む中性リン酸緩衝液で固定した。固定した胸部大動脈をパラフィン包埋し、3  $\mu$ m の切片を作製した。各切片はヘマトキシリン・エオシンで染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

## 2-8 使用薬物

ACh (Sigma-Aldrich)、Phe (ナカライテスク株式会社) および SNP (Sigma-Aldrich) は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液にて溶解した。Lucigenin (ナカライテスク株式会社) およびカルボキシメチルセルロース (富士フィルム和光純薬株式会社) は超純水にて溶解した。AST-120 (クレメジン®、株式会社クレハ) はカルボキシメチルセルロースにて懸濁した。

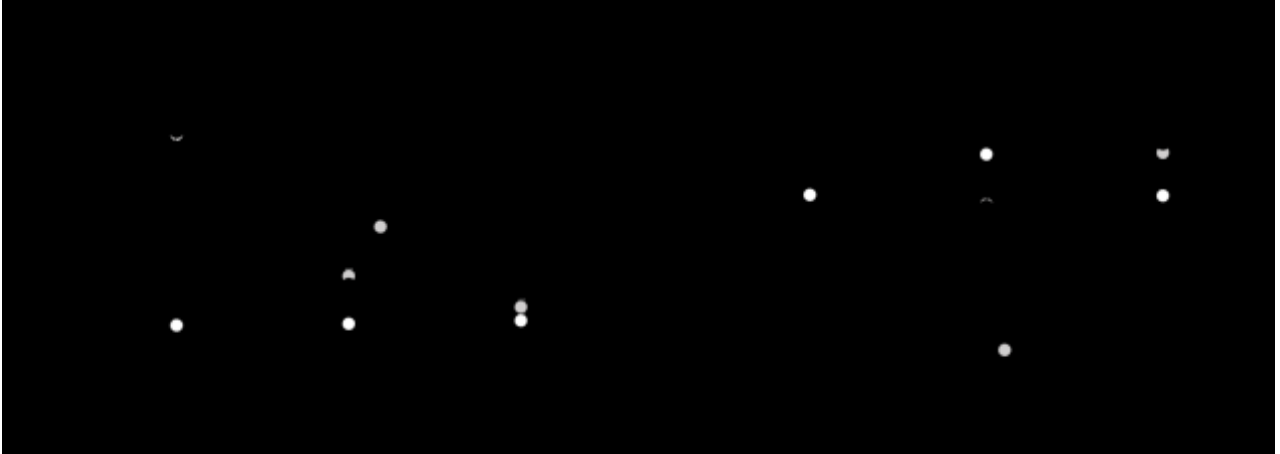
## 2-9 統計学的処理

実験結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差検定は多重比較検定を用いた。すなわち、一元配置分散分析 (one-way ANOVA test) を行い、有意差が認められた場合、Dunnett's test を用いて検定を行った。また、変数間の関係を評価するために最小二乗法による回帰分析を行った。以上の検定において、 $P < 0.05$  のとき有意差ありとした。

## 3. 実験結果

### 3-1 虚血再灌流後の腎機能推移に対する AST-120 投与の影響

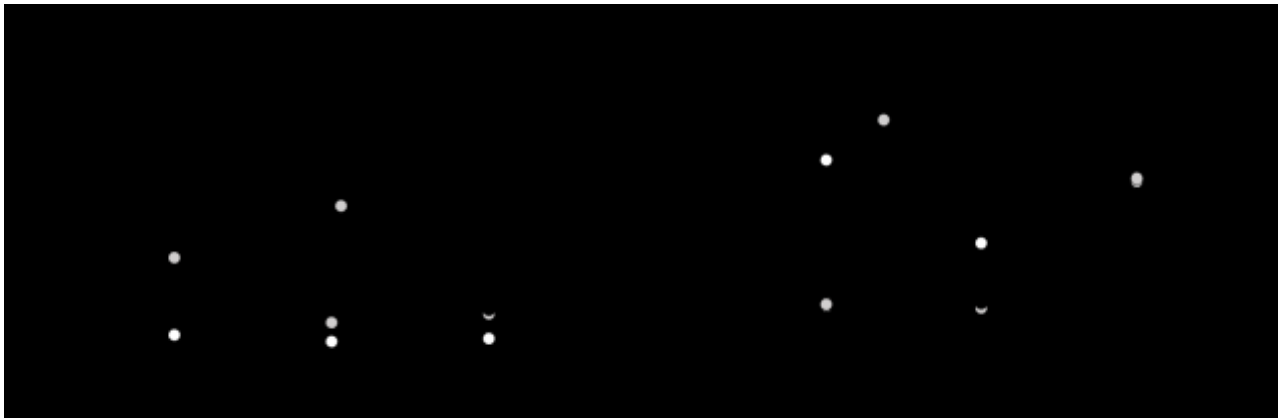
第 3 編第 1 章 3-1 項と同様に、虚血再灌流処置は再灌流 1 日後に顕著な腎機能の低下を引き起こし、その後腎機能は経時的に回復した (Figure 23)。また、再灌流後いずれの時点においても、Pcr および Ccr に AST-120 投与による影響は認められなかった。



**Figure 23.** Effects of AST-120 on renal function (a: plasma creatinine, b: creatinine clearance) after renal ischemia/reperfusion. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=5; AKI, n=7; AKI + AST-120, n=8. \*\*P<0.01, compared with AKI each day. AKI, acute kidney injury.

### 3-2 虚血再灌流後の血漿および尿中 IS 濃度に及ぼす AST-120 投与の影響

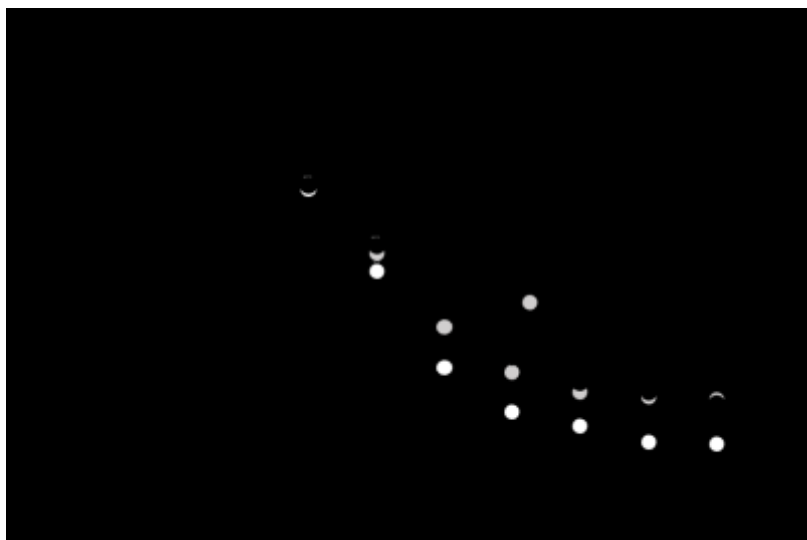
再灌流 1 日後において、AKI 群の血漿中 IS 濃度は sham 群と比較し顕著に上昇し、尿中 IS 濃度は低下した。これは虚血再灌流処置に伴う腎機能の低下により、尿中への IS の排泄が抑制されたためと考えられる。また再灌流 7 および 28 日後においては、腎機能の回復に伴って、血漿中 IS 濃度は減少し、尿中 IS 濃度はわずかに上昇傾向を示した。一方、AST-120 投与は再灌流 1 および 7 日後の血漿および尿中 IS 濃度を有意に低下させたが、再灌流 28 日後の血漿および尿中 IS 濃度は AST-120 投与の有無に関わらず同程度であった (Figure 24)。



**Figure 24.** Effects of AST-120 on IS concentration in (a) plasma and (b) urine after renal ischemia/reperfusion. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=5; AKI, n=7; AKI + AST-120, n=8. \*P<0.05 and \*\*P<0.01, compared with AKI each day. AKI, acute kidney injury; IS, indoxyl sulfate.

### 3-3 AKI に伴う血管反応性低下に対する AST-120 投与の影響

第3編第1章3-2項と同様に、再灌流28日後の胸部大動脈では、sham群と比較しAKI群においてAChに対する血管弛緩反応の有意な低下を認めたが、AST-120はこの低下を改善しなかった (Figure 25)。

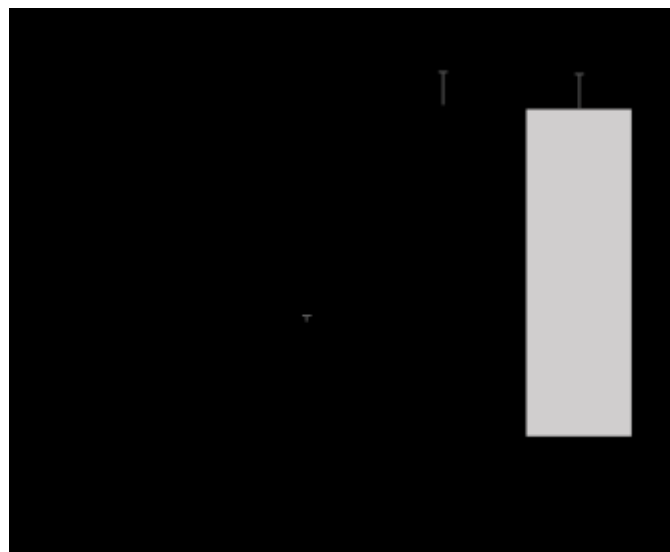


**Figure 25.** Effects of AST-120 on decreased vascular reactivity to ACh in the thoracic aorta associated with AKI. Each point and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=5; AKI, n=7; AKI + AST-120, n=8. \*\*P<0.01, compared

with AKI. AKI, acute kidney injury.

### 3-4 AKIに伴う胸部大動脈の $O_2^-$ 産生量増大に対する AST-120 投与の影響

第3編第1章3-4項と同様に、再灌流28日後の胸部大動脈では、sham群と比較しAKI群において、顕著な  $O_2^-$  産生の増大が確認された。また AST-120 の投与は、虚血再灌流処置に伴う  $O_2^-$  の産生亢進に対して何ら影響を及ぼさなかった (Figure 26)。



**Figure 26.** Effects of AST-120 on  $O_2^-$  production in the thoracic aorta associated with AKI. Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. Sham, n=5; AKI, n=6; AKI + AST-120, n=5. \*\*P<0.01, compared with AKI. AKI, acute kidney injury; RLU, relative light units;  $O_2^-$ , superoxide anion.

### 3-5 血漿中 IS 濃度と胸部大動脈における ACh に対する血管反応性および $O_2^-$ 産生との関連性

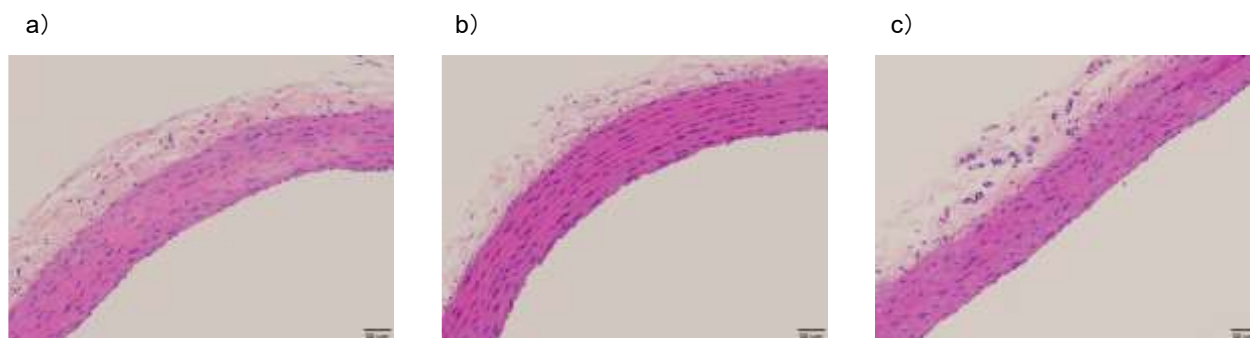
再灌流1日後の血漿中 IS 濃度と再灌流28日後の血管内皮機能および胸部大動脈の  $O_2^-$  産生との関連性を検討した。虚血再灌流処置の有無を考慮した回帰分析の結果より、再灌流1日後の血漿中 IS 濃度は、ACh の 50%効果濃度 (effective concentration 50:EC50) に近い  $10^{-7}M$  における血管弛緩率と有意な相関関係を示さないことが明らかとなった。同様に、IS 濃度と  $O_2^-$  産生にも相関関係を認めなかった (Table 1)。

	Reactivity to ACh		O <sub>2</sub> <sup>-</sup> production	
Variable	t value	P value	t value	P value
(Intercept)	22.38	<0.001	3.738	0.002
IS level	-1.068	0.301	0.581	0.571
ischemia/reperfusion (+/-)	-2.959	0.009	3.929	0.002
R <sup>2</sup>	0.578		0.744	
Adjusted R <sup>2</sup>	0.528		0.705	

**Table 1.** Summary of the least squares regression analysis for significant relationships in vascular dysfunction and O<sub>2</sub><sup>-</sup> overproduction. ACh, acetylcholine; IS, indoxyl sulfate; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion.

### 3-6 再灌流 28 日後の胸部大動脈の組織学的変化

再灌流 28 日後の胸部大動脈は ACh に対する血管反応性が著しく減弱していたことから、胸部大動脈における組織学的変化の有無を検討したが、血管内皮や平滑筋の形態学的な変化はいずれの群にも観察されなかった (Figure 27)。



**Figure 27.** Representative images of the thoracic aorta 28 days after reperfusion stained with hematoxylin-eosin. (a) sham, (b) AKI, (c) AKI+AST-120. AKI, acute kidney injury.

## 4. 考察

本章では、虚血性 AKI において上昇した IS が胸部大動脈の血管内皮機能低下の要因となるか否かについて検討した。その結果、再灌流後早期における AST-120 の投与は、虚血性 AKI に伴う血漿 IS 濃度の上昇を有意に抑制したが、血管内皮機能障害に対する有益な効果を示さな

った。すなわち、再灌流後一過性に増大する IS は、虚血性 AKI 後に生じる腎臓から遠位の血管における血管内皮機能障害の主要な原因にはならない可能性が示唆された。

本実験では第一に、虚血性 AKI モデルにおける IS の体内変動を評価した。再灌流 1 日後の顕著な腎機能の低下に伴って血漿中 IS 濃度は有意に上昇したが、その後の腎機能の回復とともに減少傾向を示した。そのため、虚血再灌流後の一時的な IS の上昇が、虚血性 AKI に併発する内皮機能障害に関与していると考え、AST-120 の効果を検討した。IS が腎障害の進行に寄与することは広く知られており、実際に虚血前の AST-120 投与は、再灌流後の血漿 IS 濃度の上昇を有意に抑制し、腎障害の発症そのものを防ぐことが報告されている<sup>85)</sup>。一方、本実験の目的は、再灌流後の IS 増加が血管機能障害に寄与するか否かを検討することであり、腎機能の改善による血管機能低下の抑制は避ける必要があった。そのため、AST-120 の虚血前投与は本目的には不適となる。またその報告では、再灌流後 3、6 および 24 時間後の AST-120 投与は、腎機能に影響を与えることなく、血漿 IS 濃度を有意に低下させることが明らかにされている<sup>85)</sup>。したがって本研究も AST-120 を再灌流 3、6 および 24 時間後に投与し、その結果既報と同様に血漿中 IS 濃度の有意な低下を認めた。しかしながら、再灌流 28 日後の血管内皮機能並びに  $O_2^-$  産生において AST-120 投与による明らかな影響はみられなかった。さらに、再灌流 1 日後の血漿中 IS 濃度と再灌流 28 日後の ACh に対する血管反応性や  $O_2^-$  産生との間にも相関関係を認めなかった。これらのことから、再灌流直後の一時的な IS 増加は、虚血性 AKI に伴う胸部大動脈の内皮機能低下に関与しない可能性が示唆された。

虚血性 AKI において、再灌流直後の AST-120 投与は、著明に上昇した血清 IS 濃度を sham レベルまで抑制することなく、AKI による心機能障害を改善することが報告されている<sup>90)</sup>。それゆえ、実験当初は本研究で確認された虚血性 AKI に併発する血管内皮機能の減弱も、血漿 IS 濃度の部分的な低下により改善されると考えていた。興味深いことに、CKD モデルラットに対する AST-120 投与は、血管内皮機能障害を顕著に改善させるが、血清 IS 濃度は約 56%しか抑制されず、sham より高値であったことが報告されている<sup>88)</sup>。本研究では、再灌流 1 日後の血漿 IS 濃度は AST-120 投与により 62%抑制され、AST-120 の薬効は前述の既報と同程度であったにも関わらず、血管内皮機能の改善作用は認められなかった。以上のことから、虚血性 AKI において再灌流直後に一時的に上昇する IS と、CKD において慢性的に上昇する IS では、血管内皮機能障害

に対する寄与度は大きく異なる可能性が示唆された。

近年、AKI 後の遠隔臓器障害の原因の一つとして、全身の過剰な炎症反応の関与が報告されている<sup>91)</sup>。例えば、AKI 後の炎症カスケードの異常な亢進は、血漿 IL-6 濃度を著しく増加させ、肺障害を引き起こすことが明らかにされている<sup>92)</sup>。注目すべきは、マクロファージによる炎症性サイトカインの放出を抑制する CNI-1493 の投与は、AKI 発症後の腎機能には影響を与えることなく、肺動脈の血管透過性亢進を改善したことである<sup>93)</sup>。加えて、過剰な炎症反応に伴い好中球は ROS 産生を亢進させるため、AKI 後に生じる全身の炎症反応が腎臓以外の臓器の ROS 産生に寄与している可能性も考えられる<sup>92)</sup>。したがって、今後 AKI 後の炎症反応と遠隔部位の ROS 産生並びに血管内皮機能障害との関連性について詳細な検討が必要と考えられる。

以上のことから、再灌流後早期における AST-120 の投与は、血漿中 IS 濃度を有意に低下させるにも関わらず、血管内皮機能障害を改善するまでには至らないことが示された。すなわち、再灌流後一過性に増大する IS は、虚血性 AKI に伴う腎臓から遠位の血管における血管内皮機能破綻の主要な原因ではない可能性が示唆された。

## 小括

1. 虚血性 AKI モデルラットにおいて、腎機能が顕著に低下した際の血管内皮機能は正常であった。しかしながら、その後の経時的な腎機能の回復とは相反して内皮機能は悪化することを明らかとした。
2. 虚血再灌流後に生じる胸部大動脈における  $O_2^-$  産生の亢進が、血管内皮機能の低下に寄与している可能性が示唆された。
3. 再灌流後一過性に増大する IS は、虚血性 AKI に伴う血管内皮機能破綻の主要な原因ではないことを明らかにした。



## 結 語

CKD に併発する CVD の原因となる尿毒素 IS および kyn は、血管内皮および血管平滑筋において過剰な  $O_2^-$  産生を引き起こし、血管緊張調節において重要な役割を果たす NO を捕捉・不活化することで、血管弛緩反応を減弱させることが示された。また、虚血性 AKI モデルを用いた検討により、AKI 発症後の腎機能の経時的な回復とは相反し、胸部大動脈の血管内皮機能は減弱することを確認した。しかしながら、再灌流直後に上昇した IS は血管内皮機能低下の主な原因分子ではないことも明らかにした。ただし、胸部大動脈血管内皮機能の低下が AKI to CKD の要因の一つである可能性も考えられ、今後詳細な検討が必要である。

## 論文目録

本論文の内容の一部は、次の雑誌に公表した。

- 1) Nakagawa K., Itoya M., Takemoto N., Matsuura Y., Tawa M., Matsumura Y., Ohkita M., Indoxyl sulfate induces ROS production via the aryl hydrocarbon receptor-NADPH oxidase pathway and inactivates NO in vascular tissues. *Life Sci.*, 265, 118807 (2021).
- 2) Nakagawa K., Kobayashi F., Kamei Y., Tawa M., Ohkita M., Acute kynurenine exposure of rat thoracic aorta induces vascular dysfunction via superoxide anion production. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press).
- 3) Nakagawa K., Tanaka R., Donouchi M., Kanda M., Kamada S., Kobuchi S., Tawa M., Matsumura Y., Ohkita M., Vascular Endothelial Dysfunction in the Thoracic Aorta of Rats with Ischemic Acute Kidney Injury: Contribution of Indoxyl Sulfate. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2022, 7547269 (2022).

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なご指導ご鞭撻を賜りました大喜多 守 教授(大阪医科薬科大学 薬学部 病態分子薬理学研究室)並びに松村 靖夫 前教授(大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室)に深甚なる謝意と敬意を表します。

本研究に対して、適切な御助言を賜りました、田和 正志 准教授(大阪医科薬科大学 薬学部 病態分子薬理学研究室)に深く感謝致します。

また本研究の遂行に際し、種々のお力添えを頂戴しました、小淵 修平 講師(兵庫医科大学 薬学部 医療薬学科)に深謝致します。

最後に、本研究に多大なる御協力を頂戴しました、大阪医科薬科大学 薬学部 病態分子薬理学研究室員の皆さまに心から感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018、日本腎臓学会
- 2) Tanaka K, Watanabe T, Takeuchi A, Ohashi Y, Nitta K, Akizawa T, Matsuo S, Imai E, Makino H, Hishida A. Cardiovascular events and death in Japanese patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 91, 227-234 (2017).
- 3) Gansevoort RT, Rotter RC, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 382, 339-352 (2013).
- 4) Palazzuoli A, Antonelli G, Nuti R. Anemia in Cardio-Renal Syndrome: clinical impact and pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail. Rev.*, 16, 603-607 (2011).
- 5) Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.*, 342, 145-153 (2000).
- 6) Duranton F, Cohen G, Smet RD, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles S. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 23, 1258-1270 (2012).
- 7) Wojtaszek E, Oldakowska-Jedynak U, Kwiatkowska M, Glogowski T, Malyszko J. Uremic Toxins, Oxidative Stress, Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease, and Kidney Transplantation. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2021, 6651367 (2021).
- 8) Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.*, 63, 1934-1943 (2003).
- 9) Lim YJ, Sidor NA, Tonial NC, Che A, Urquhart BL. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins (Basel)*, 13, 142 (2021).

- 10) Lo LJ, Go AS, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Hsu CY. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 76, 893-899 (2009).
- 11) James MT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Pannu N, Manns BJ, Klarenbach SW, Tonelli M. Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: a cohort study. *Lancet*, 376, 2096-2103 (2010).
- 12) Hsu RK, McCulloch CE, Dudley RA, Lo LJ, Hsu CY. Temporal changes in incidence of dialysis-requiring AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24, 37-42 (2013).
- 13) Singh P, Ricksten SE, Bragadottir G, Redfors B, Nordquist L. Renal oxygenation and haemodynamics in acute kidney injury and chronic kidney disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 40, 138-147 (2013).
- 14) Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, Collins AJ. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20, 223-228 (2009).
- 15) Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K, Haga H, Sharma K, Yanagita M. Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 27, 2393-2406 (2016).
- 16) Salama M, Farrag SM, abulasrar Sa, Amin MM, Ali AA, Sheashaa H, Sobh M, Arias-Carrión O. Up-regulation of TLR-4 in the brain after ischemic kidney-induced encephalopathy in the rat. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 12, 583-586 (2013).
- 17) Lie ML, White LE, Santora RJ, Park JM, Rabb H, Hassoun HT. Lung T lymphocyte trafficking and activation during ischemic acute kidney injury, *J. Immunol.*, 189, 2843-2851 (2012).
- 18) Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, Zahedi K, Lentsch AB, Soleimani M. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int.*, 75, 783-792 (2009).
- 19) Burchill L, Velkoska E, Dean RG, Lew RA, Smith AI, Levidiotis V, Burrell LM. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression. *Exp. Physiol.*, 93, 622-630 (2008).

- 20) Shlomo YB, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, Boutouyrie P, Cameron J, Chen CH, Cruickshank JK, Hwang SJ, Lakatta EG, Laurent S, Maldonado J, Mitchell GF, Najjar SS, Newman AB, Ohishi M, Pannier B, Pereira T, Vasan RS, Shokawa T, Tyrell KS, Verbeke F, Wang KL, Webb DJ, Hansen TW, Zoungas S, McEniery CM, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63, 636-646 (2013).
- 21) Pawlak K, Myśliwiec M, Pawlak D. Kynurenine pathway - a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv. Med. Sci.*, 55, 196-203 (2010).
- 22) van der Vorm LN, Visser R, Huskens D, Veninga A, Adams DL, Remijn JA, Hemker HC, Rensma PL, van Horssen R, de Laat B. Circulating active von Willebrand factor levels are increased in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Clin. Kidney J.*, 13, 72-74 (2019).
- 23) Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu S, Leung SW. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ. Res.*, 119, 375-396 (2016).
- 24) Yasmeen S, Akram BH, Hainsworth AH, Kruuse C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) and endothelial function in ischaemic stroke. A review. *Cell Signal.*, 61, 108-119 (2019).
- 25) Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 115, 5839-5848 (2018).
- 26) Vera M, Torramade-Moix S, Martin-Rodriguez S, Cases A, Cruzado JM, Rivera J, Escolar G, Palomo M, Diaz-Ricart M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Strategies Based on the Potentiation of Glutathione Peroxidase Activity Prevent Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Cell Physiol. Biochem.*, 51, 1287-1300 (2018).
- 27) González-Blázquez R, Somoza B, Gil-Ortega M, Martín Ramos M, Ramiro-Cortijo D, Vega-Martín E, Schulz A, Ruilope LM, Kolkhof P, Kreutz R, Fernández-Alfonso MS. Finerenone Attenuates Endothelial Dysfunction and Albuminuria in a Chronic Kidney Disease Model by a Reduction in Oxidative Stress. *Front Pharmacol.*, 9, 1131 (2018).

- 28) Dupont JJ, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG. Ascorbic acid or L-arginine improves cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *J. Appl. Physiol* (1985), 111, 1561-1567 (2011).
- 29) Yu M, Kim YJ, Kang DH. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 6, 30-39 (2011).
- 30) Tumor Z, Niwa T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. *Am. J. Nephrol.*, 29, 551-557 (2009).
- 31) Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.*, 5, 1302-1308 (2007).
- 32) Watanabe I, Tatebe J, Namba S, Koizumi M, Yamazaki J, Morita T. Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circ. J.*, 77, 224-230 (2013).
- 33) Niwa T, Miyazaki T, Tsukushi S, Maeda K, Tsubakihara Y, Owada A, Shigai T. Accumulation of indoxyl-beta-D-glucuronide in uremic serum: suppression of its production by oral sorbent and efficient removal by hemodialysis. *Nephron.* 74, 72-78 (1996).
- 34) Pinel-Marie ML, Sparfel L, Desmots S, Fardel O. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47 phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst. *Free Radic. Biol. Med.*, 47, 825-834 (2009).
- 35) Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Acute Exposure to Indoxyl Sulfate Impairs Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Aorta. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 338 (2019).
- 36) Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open*, 11, 1-9 (2018).
- 37) Wada T, Sunaga H, Ohkawara R, Shimba S. Aryl hydrocarbon receptor modulates NADPH oxidase activity via direct transcriptional regulation of p40phox expression. *Mol. Pharmacol.*, 83,

1133-1140 (2013).

- 38) Ito S, Osaka M, Edamatsu T, Itoh Y, Yoshida M. Crucial role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in indoxyl sulfate-induced vascular inflammation. *J. Atheroscler. Thromb.*, 23, 960-975 (2016).
- 39) Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 24, 2051-2058 (2009).
- 40) Adelibieke Y, Yisireyili M, Ng HY, Saito S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate induces IL-6 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells through OAT3-mediated uptake and activation of AhR/NF- $\kappa$ B pathway. *Nephron Exp. Nephrol.*, 128, 1-8 (2014).
- 41) Bock KW. Human AHR functions in vascular tissue: Pro- and anti-inflammatory responses of AHR agonists in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.*, 159, 116-120 (2019).
- 42) Dabir P, Marinic TE, Krukovets I, Stenina OI. Aryl hydrocarbon receptor is activated by glucose and regulates the thrombospondin-1 gene promoter in endothelial cells. *Circ. Res.*, 102, 1558-1565 (2008).
- 43) Santana Machado T, Poitevin S, Paul P, McKay N, Jourde-Chiche N, Legris T, Mouly-Bandini A, Dignat-George F, Brunet P, Masereeuw R, Burtsey S, Cerini C. Indoxyl Sulfate Upregulates Liver P-Glycoprotein Expression and Activity through Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 29, 906-918 (2018).
- 44) Jansen J, Fedecostante M, Wilmer MJ, Peters JG, Kreuser UM, van den Broek PH, Mensink RA, Boltje TJ, Stamatialis D, Wetzels JF, van den Heuvel LP, Hoenderop JG, Masereeuw R. Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins. *Sci. Rep.*, 6, 26715 (2016).
- 45) Zhang J, Zhang R, Wang Y, Li H, Han Q, Wu Y, Wang T, Liu F. The Level of Serum Albumin Is Associated with Renal Prognosis in Patients with Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes. Res.*, 2019, 7825804 (2019).
- 46) Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat.*



- Rev. Drug Discov., 5, 755-768 (2006).
- 47) Lu CL, Zheng CM, Lu KC, Liao MT, Wu KL, Ma MC. Indoxyl-Sulfate-Induced Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)*, 10, 936 (2021).
  - 48) McMahon EG, Paul RJ. Effects of forskolin and cyclic nucleotides on isometric force in rat aorta. *Am. J. Physiol.*, 250, C468-473 (1986).
  - 49) García-Morales V, Cuññas A, Elies J, Campos-Toimil M. PKA and Epac activation mediates cAMP-induced vasorelaxation by increasing endothelial NO production. *Vascul. Pharmacol.*, 60, 95-101 (2014).
  - 50) Modoux M, Rolhion N, Mani S, Sokol H. Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. *Trends Pharmacol. Sci.*, 42, 60-73 (2021).
  - 51) Cheng Y, Li Y, Benkowitz P, Lamina C, Kottgen A, Sekula P. The relationship between blood metabolites of the tryptophan pathway and kidney function: a bidirectional Mendelian randomization analysis. *Sci. Rep.*, 10, 12675 (2020).
  - 52) Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int. J. Tryptophan Res.*, 10, 1178646917691938 (2017).
  - 53) Takikawa O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-inhibited L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 12-19 (2005).
  - 54) Jiang N, Zhao G, Lin J, Hu L, Che C, Li C, Wang Q, Xu Q, Peng X. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Involved in the Inflammation Response of Corneal Epithelial Cells to *Aspergillus fumigatus* Infections. *PLoS One*, 10, e0137423 (2015).
  - 55) Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Volk HD, Schuett C, Reinke P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 24, 1901-1908 (2009).
  - 56) Pan B, Zhang F, Sun J, Chen D, Huang W, Zhang H, Cao C, Wan X. Correlation of Indoleamine-2,3-Dioxygenase and Chronic Kidney Disease: A Pilot Study. *J. Immunol. Res.*, 8132569 (2021).
  - 57) Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M.

- Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 279, F565-F572 (2000).
- 58) Cernaro V, Loddo S, Macaione V, Ferlazzo VT, Cigala RM, Crea F, Stefano CD, Genovese ARR, Gembillo G, Bolignano D, Santoro D, Vita R, Buemi M, Benvenga S. RAS inhibition modulates kynurenine levels in a CKD population with and without type 2 diabetes mellitus. *Int. Urol. Nephrol.*, 52, 1125-1133 (2020).
- 59) Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Kynurenine pathway - a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv. Med. Sci.*, 55, 196-203 (2010).
- 60) Vorm LN, Visser R, Huskens D, Veninga A, Adams DL, Remijn JA, Hemker HC, Rensma PL, Horssen R, Laat B. Circulating active von Willebrand factor levels are increased in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Clin. Kidney J.*, 13, 72-74 (2019).
- 61) Kolachalama VB, Shashar M, Alousi F, Shivanna S, Rijal K, Belghasem ME, Walker J, Matsuura S, Chang GH, Gibson CM, Dember LM, Francis JM, Ravid K, Chitalia VC. Uremic Solute-Aryl Hydrocarbon Receptor-Tissue Factor Axis Associated with Thrombosis after Vascular Injury in Humans. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 29, 1063-1072 (2018).
- 62) Song H, Park H, Kim YS, Kim KD, Lee HK, Cho DH, Yang JW, Hur DY. L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int. Immunopharmacol.*, 11, 932-938 (2011).
- 63) Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, 204, 309-314 (2009).
- 64) Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AHS, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K, Schmidt HHHW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*, 56, 490-497 (2010).
- 65) Ramadass P, Meerarani P, Toborek M, Robertson LW, Hennig B. Dietary Flavonoids Modulate

- PCB-Induced Oxidative Stress, CYP1A1 Induction, and AhR-DNA Binding Activity in Vascular Endothelial Cells. *Toxicol. Sci.*, 76, 212-219 (2003).
- 66) Hoshi M, Osawa Y, Nakamoto K, Morita N, Yamamoto Y, Ando T, Tashita C, Nabeshima T, Saito K. Kynurenine produced by indoleamine 2,3-dioxygenase 2 exacerbates acute liver injury by carbon tetrachloride in mice. *Toxicology*, 438, 152458 (2020).
- 67) Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Kynurenine, by activating aryl hydrocarbon receptor, decreases erythropoietin and increases hepcidin production in HepG2 cells: A new mechanism for anemia of inflammation. *Exp Hematol*, 44, 60-67 (2016).
- 68) Kaiser H, Yu K, Pandya C, Mendhe, B, Isales, CM, McGee-Lawrence, ME, Johnson, M, Fulzele S, Hamrick MW. Kynurenine, a Tryptophan Metabolite That Increases with Age, Induces Muscle Atrophy and Lipid Peroxidation. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019, 9894238 (2019).
- 69) Uchino S, Kellum J.A, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C. Acute renal failure in critically ill patients. *JAMA.*, 294, 813-818 (2005).
- 70) Aggarwal D, Singh G. Effects of single and dual RAAS blockade therapy on progressive kidney disease transition to CKD in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 393, 615-627(2020).
- 71) Guzzi F, Cirilo L, Roperto RM, Romagnani P, Lazzeri E. Molecular Mechanisms of the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition: An Updated View. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 4941 (2019).
- 72) Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15, 1983-1992 (2004).
- 73) Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Tojo A, Nishimatsu H, Nakanishi N, Hattori Y, Kikuchi K, Nagano T, Omata M. Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 301-309 (2000).
- 74) Kingma JG, Vincent JC, Rouleau JR, Kingma I. Influence of acute renal failure on coronary vasoregulation in dogs. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 1316-1324 (2006).
- 75) Kim J, Jang HS, Park KM. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion

- trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298, F158-F166 (2010).
- 76) Knock GA. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signaling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. *Free Radic. Biol. Med.*, 145, 385-427 (2019).
- 77) Gammelager H, Christiansen CF, Johansen MB, Tonnesen E, Jespersen B, Sorensen HT. Three-year risk of cardiovascular disease among intensive care patients with acute kidney injury: a population-based cohort study. *Crit. Care*, 18, 492 (2014).
- 78) Persson F, Rossing P, Hovind P, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG, Tarnow L, Parving HH. Endothelial dysfunction and inflammation predict development of diabetic nephropathy in the irbesartan in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria (IRMA-2) study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 68, 731-738 (2008).
- 79) Chen H, Fang Y, Wu J, Chen H, Zou Z, Zhang X, Shao J, Xu Y. RIPK3-MLKL-mediated necroinflammation contributes to AKI progression to CKD. *Cell Death Dis.*, 9, 878 (2018).
- 80) Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets*, 14, 3-14 (2014).
- 81) Versteilen AMG, Korstjens IJM, Musters RJP, Groeneveld ABJ, Sipkema P. Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 291, F606-F611 (2006).
- 82) Bhalodia YS, Sheth NR, Vaghasiya JD, Jivani NP. Homocysteine-dependent endothelial dysfunction induced by renal ischemia/reperfusion injury. *J. Nephrol.*, 24, 631-635 (2011).
- 83) Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, Jimenez MTB, Mirski KV, Helmstadter J, Schon SK, Munzel T, Daiber A. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 7092151 (2019).
- 84) Phillips SA, Pechman KR, Leonard EC, Friedrich JL, Bian JT, Beal AG, Basile DP. Increased ANG II sensitivity following recovery from acute kidney injury: role of oxidant stress in skeletal muscle resistance arteries. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 298, R1682-R1691 (2010).

- 85) Saito H, Yoshimura M, Saigo C, Komori M, Nomura Y, Yamamoto Y, Sagata M, Wakida A, Chuman E, Nishi K, Jono H. Hepatic sulfotransferase as a nephroprotecting target by suppression of the uremic toxin indoxyl sulfate accumulation in ischemic acute kidney injury. *Toxicol. Sci.*, 141, 206-217 (2014).
- 86) Taguchi K, Elias BC, Brooks CR, Ueda S, Fukami K. Uremic Toxin-Targeting as a Therapeutic Strategy for Preventing Cardiorenal Syndrome. *Circ. J.*, 84, 2-8 (2019).
- 87) Lekawanvijit S. Cardiotoxicity of Uremic Toxins: A Driver of Cardiorenal Syndrome. *Toxins (Basel)*, 10, 352 (2018).
- 88) Namikoshi T, Tomita N, Satoh M, Sakuta T, Kuwabara A, Kobayashi S, Higuchi Y, Nishijima F, Kashihara N. Oral adsorbent AST-120 ameliorates endothelial dysfunction independent of renal function in rats with subtotal nephrectomy. *Hypertens. Res.*, 32, 194-200 (2009).
- 89) Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Kobuchi S, Ayajiki K, Manabe E, Masuyama T, Jun-Ichi S, Tsujino T. Neutrophil/lymphocyte ratio elevation in renal dysfunction is caused by distortion of leukocyte hematopoiesis in bone marrow. *Ren. Fail.*, 41, 284-293 (2019).
- 90) Shen WC, Chou YH, Shi LS, Chen ZW, Tu HJ, Lin XY, Wang GJ. AST-120 Improves Cardiac Dysfunction in Acute Kidney Injury Mice via Suppression of Apoptosis and Proinflammatory NF- $\kappa$ B/ICAM-1 Signaling. *J. Inflamm. Res.*, 14, 505-518 (2021).
- 91) Grams ME, Rabb H. The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney Int.*, 81, 942-948 (2012).
- 92) Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction. *Anesthesiology*, 116, 1139-1148 (2012).
- 93) Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int.*, 55, 2362-2367 (1999).