

第 38 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

大島賞受賞講演 2

# 尿毒症物質に着目した慢性腎臓病関連疾患の病態解明と治療

Molecular mechanisms underlying uremic toxin-induced diseases in chronic kidney disease and therapeutic interventions

山本 卓

Suguru YAMAMOTO

## はじめに

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) の発症と進行に伴って心血管病, 骨関節疾患, 感染症, 悪性腫瘍など種々の疾患の発症頻度が増加し, CKD 患者の生命予後, 生活の質 (quality of life : QOL) に影響を及ぼしている。この現象は特に透析患者で顕著であり, それらに関連する CKD 固有の因子が同定され, 予防あるいは治療につながるべく研究が進められている。そのなかで尿毒症物質は, CKD 関連因子のなかで最も有力な原因物質であり, これまで50年間にわたって透析療法の普及とその治療法の改良が脈々と続いてきた。

筆者らは, CKD 関連疾患, 特に透析アミロイドーシスと動脈硬化についての病態解明と治療について, 尿毒症物質の関与に着目して研究を進めてきた。それらを通じて CKD 患者の生命予後あるいは QOL が向上すべく, 治療法の開発を模索している。

## 尿毒症物質

尿毒症物質は以下の通りに定義される。1. 腎機能障害の進行に伴い血中濃度が増加する, 2. 血中濃度の定量が可能である, 3. 血中濃度の増加と尿毒症症状の関連を認める, 4. 腎臓病患者レベルの血中濃度増加は尿毒症に関連した症

状を引き起こす。これらの条件を満たすものを尿毒症物質とし, European Uremic Toxin (EUTox) work group はそれらを分子量と蛋白結合の特性に分けて3群に分類した<sup>1)</sup>。

本稿では, 1) 水溶性中分子量物質である  $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2$ -m) とそれによる透析アミロイドーシス, 2) インドキシル硫酸をはじめとする蛋白結合分子とそれによる動脈硬化について, われわれの研究成果を中心に概説したい。

## $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2$ -m) と透析アミロイドーシス

中分子量尿毒症物質である  $\beta_2$ -m はその血中濃度高値が CKD 患者の生命予後に影響する<sup>2)</sup>ほか, 透析関連アミロイドーシスの前駆蛋白質である<sup>3)</sup>ことが知られている。 $\beta_2$ -m から成るアミロイド線維は長期透析患者の骨関節組織を中心に沈着し, 手根管症候群, 破壊性脊椎関節症などを発症させ, さらに進行すると心臓血管をはじめとする各臓器に沈着し機能障害を起こす<sup>4)</sup>。アミロイド線維が  $\beta_2$ -m モノマーから形成され伸長する過程は, 重合核依存性重合モデルに従う<sup>5)</sup>。この反応は重合核形成相と線維伸長相から成り, 重合核形成相は熱力学的に起こりにくく線維形成反応の律速段階となる。ひとたび重合核が形成されると, 線維伸長は一次反応速度論に従いアミロイド線維の伸長が加速する。これまで試験管内アミロイド線維伸長反応により透析アミロイドーシスの病態解明が進められたが, アミロイド線維は pH 2.5 という極度な酸性環境下でのみ線維伸長反

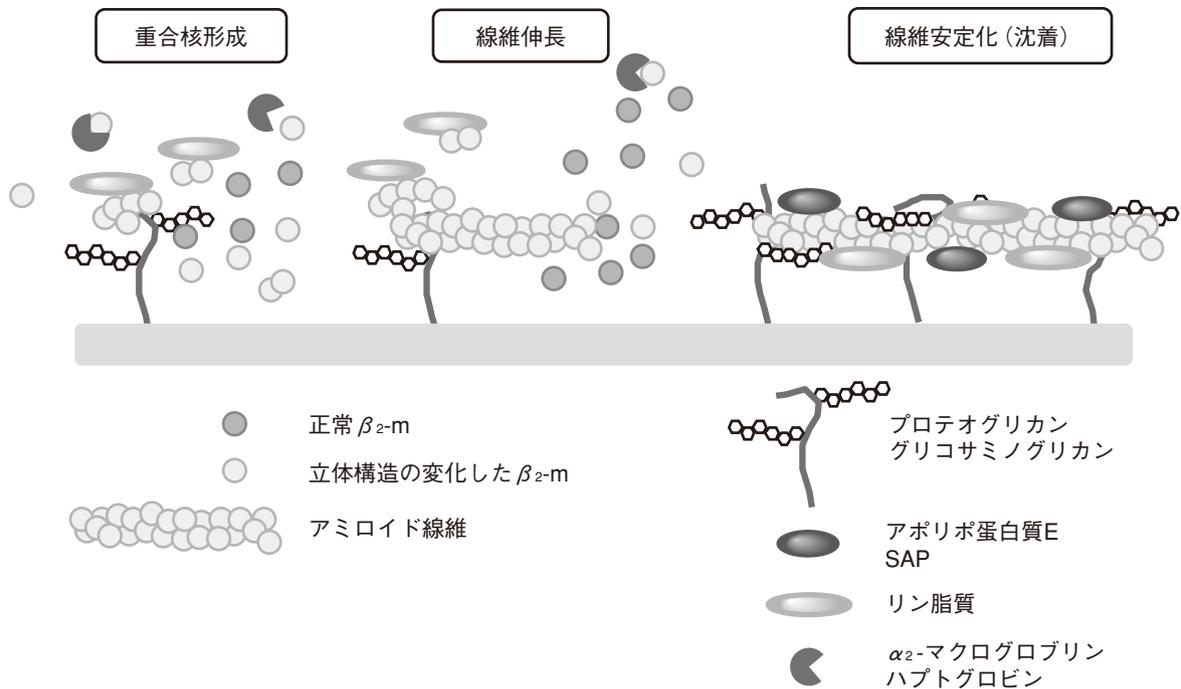


図1  $\beta_2$ -ミクログロブリン関連アミロイド線維形成から沈着までの作業仮説

慢性腎臓病患者で増加した  $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2$ -m) はリン脂質などの生体分子との相互作用によって立体構造を変化させ、骨関節組織を中心にアミロイド線維を形成し伸長する (重合核依存性重合モデル)。伸長した線維の周りにグリコサミノグリカンなどが結合することにより線維構造を安定化させ、組織への沈着を促進する。近年、 $\alpha_2$ -マクログロブリンやハプトグロビンは、細胞外シャペロンとして立体構造の変化した  $\beta_2$ -m モノマーと反応することにより線維形成を抑制していることが明らかにされた。(文献5より引用, 改変)

応が観察された<sup>6)</sup>。その理由の一つに  $\beta_2$ -m モノマーの立体構造変化があげられる。すなわち  $\beta_2$ -m モノマーは、pH 2.5 で  $\beta$ シート構造から成る天然構造を  $\alpha$ ヘリックスあるいはランダム構造を持った中間体に変化させ、その結果、線維断端に速やかに結合することで線維伸長がなされる。われわれは、中性 pH でも  $\beta_2$ -m モノマーの立体構造を変化させ、アミロイド線維伸長反応を実現できるよう検討を進めた。その結果、低濃度のトリフルオロエタノール (2,2,2-trifluoroethanol : TFE)<sup>7)</sup> やドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS)<sup>8)</sup> は中性 pH で  $\beta_2$ -m モノマーの立体構造を変化させ、アミロイド線維伸長反応が起こることを明らかにした。SDS はリン脂質のアナログであり、生体内でアミロイドーシスの進展に促進的に作用している可能性がある。また、透析アミロイドーシスが発症しやすい骨関節組織の細胞外マトリックスは種々のプロテオグリカンにより構成される。プロテオグリカンはコア蛋白とグリコサミノグリカンから成るため、グリコサミノグリカンのアミロイド線維伸長反応に与える効果を検討した。ヘパリンをはじめとする数種のグリコサミノグリカンは TFE を用いた

中性 pH での  $\beta_2$ -m アミロイド線維伸長反応を促進した<sup>7)</sup>。伸長した線維に結合したヘパリンを確認できたことから、グリコサミノグリカンはアミロイド線維に結合することで線維構造を安定化させ、アミロイド線維伸長反応を増強すると考えた。

以上の結果から、以下の作業仮説が提案される (図1)<sup>5)</sup>。CKD で増加した  $\beta_2$ -m は、リン脂質などの生体分子との相互作用によって立体構造を変化させ、骨関節組織を中心にアミロイド線維を形成し伸長する (重合核依存性重合モデル)。伸長した線維の周りにヘパリンをはじめとするグリコサミノグリカンなどが結合することにより線維構造を安定化させ、組織への沈着を促進する。近年、 $\alpha_2$ -マクログロブリンやハプトグロビンは細胞外シャペロンとして立体構造の変化した  $\beta_2$ -m モノマーと反応することにより線維形成を抑制していることが明らかにされた。試験管内アミロイド線維形成・伸長反応モデルにより透析アミロイドーシスの発症、進展に関連する生体分子の候補があげられたが、今後、それらの反応と生体で起こっている事象との関連を観察する必要がある。それらを明らかにすることによ

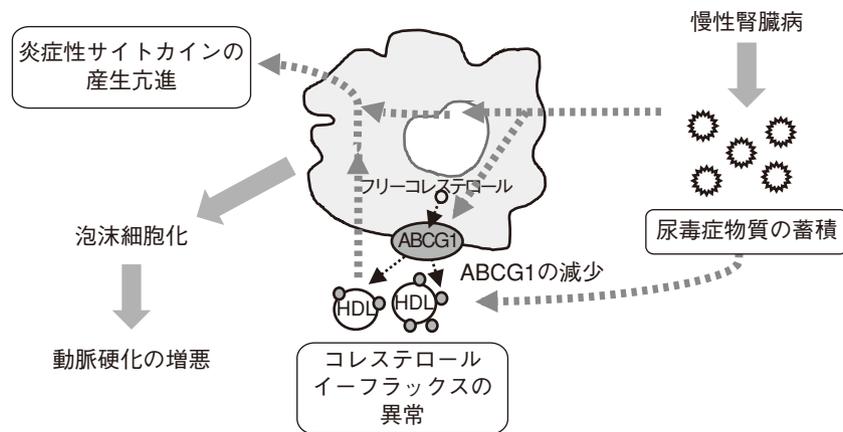


図2 腎臓病で増悪するマクロファージ泡沫細胞化に関する尿毒症物質

慢性腎臓病で増加するインドキシル硫酸をはじめとする尿毒症物質は、マクロファージに直接作用することで炎症反応や脂質排泄障害をきたす。また腎臓病患者 HDL はマクロファージに炎症を促進させ、細胞からの脂質引き抜き能が低下する。慢性腎臓病はマクロファージと HDL それぞれに直接的に作用することでそれぞれの機能異常を引き起こす結果、泡沫細胞化を促進する。(文献 17 より引用, 改変)

り、更なる臨床的な病態解明とバイオマーカーや予防・治療法の提案が期待される。

### 蛋白結合尿毒症物質と動脈硬化

CKDは動脈硬化、血管石灰化に起因する心血管病のリスクファクターである。蛋白結合性の高いインドキシル硫酸、p-クレシル硫酸、インドール酢酸は、CKDの進行に伴い血中濃度が増加し心血管病に関連すると報告されている<sup>9~11)</sup>。基礎研究では、動脈硬化マウスモデルであるアポリポ蛋白質Eノックアウトマウスに腎臓全摘を行うと動脈硬化が著しく進展する<sup>12)</sup>。動脈硬化病変内マクロファージは腎障害により炎症性M1フェノタイプが増加し、抗炎症のM2マクロファージが減少することでマクロファージの泡沫細胞化、プラークの増加を変化させることが示された。そのメカニズムとして、われわれはレニン・アンジオテンシン系<sup>13)</sup>、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ <sup>14)</sup>のほか、蛋白結合尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸<sup>12)</sup>が影響していることを同実験モデルで明らかにした。インドキシル硫酸は、マクロファージと直接反応することでインターロイキン $1\beta$ 、腫瘍壊死因子 $\alpha$ などの炎症性サイトカインや活性酸素の産生を増加させた<sup>15)</sup>。また、インドキシル硫酸と反応したマクロファージはhigh density lipoprotein (HDL) コレステロールと反応した際に、細胞内から脂質の放出(コレステロールイーフラックス)を低下させることが明らかとなった<sup>15)</sup>。

CKDはHDLの機能異常ももたらし、マクロファージ泡沫細胞化に影響している。血液透析患者血漿から密度勾配遠心法により精製したHDLは、非腎臓病由来HDLと比較してマクロファージコレステロールイーフラックスが低下した<sup>16)</sup>。また、これまで抗炎症作用があるとされていたHDLであるが、透析患者由来HDLはむしろマクロファージの炎症反応や単球の走化性を増強した<sup>16)</sup>。

以上から、腎臓病で増加するインドキシル硫酸をはじめとする尿毒症物質は、マクロファージやHDLに作用することでそれぞれの機能異常を引き起こし、泡沫細胞化を促進させるのではないかと考えた(図2)<sup>17)</sup>。

### 尿毒症物質の除去効率を向上させる取り組み

これまでの研究成果から、血液浄化療法による尿毒症物質の除去効率の向上がCKD関連疾患の予防・治療に重要であると考えられる。透析器の改良、透析時間の長期化などにより水溶性低分子量物質、中分子量物質の除去効率は向上しているが、蛋白結合尿毒症物質の除去は現行の血液浄化療法では不十分である。例えば、インドキシル硫酸の蛋白結合率は98%であり、そのため通常の血液透析による除去率は32%にすぎない<sup>18)</sup>。これまで血液透析濾過などいくつかの血液浄化療法による除去効率の改善が報告されたが、その効果は大きくなく、臨床的に心血管病をはじめとするCKD関連疾患を解決するうえで十分だとは考えにくい。その点で、経口吸着炭薬AST-120は、保存期CKD

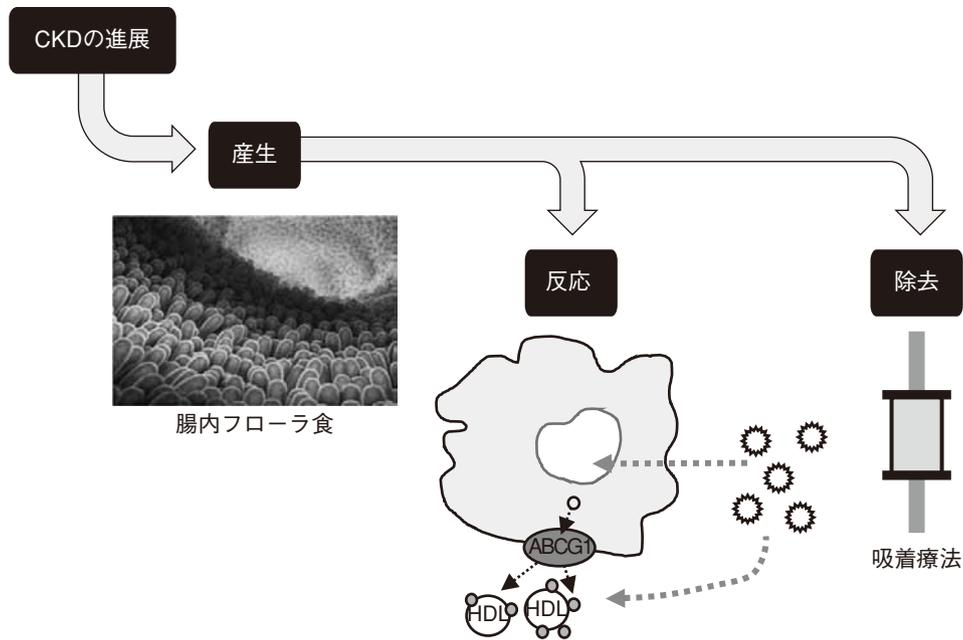


図3 蛋白結合尿毒症物質が関連する全身疾患の予防・治療戦略

慢性腎臓病関連疾患の予防・治療として、腎機能の保持はもちろんのこと、腸内フローラに介入した産生の低下、臓器障害をきたす細胞・組織それぞれとの反応抑制、そして増加・蓄積した尿毒症物質除去の向上がターゲットとしてあげられる。(筆者作成)

患者に腎機能保持目的に使用され、血中インドキシル硫酸濃度を低下させたという<sup>19)</sup>。透析患者ではインドキシル硫酸をはじめとする蛋白結合尿毒症物質の蓄積がより高度であり、AST-120の効果が保存期CKDより大きく現われ、CKD関連疾患を改善する可能性を考えた。実際にマウス動脈硬化モデルでは、腎全摘マウスにAST-120を使用すると動脈硬化病変のインドキシル硫酸の沈着が改善するとともに動脈硬化も改善した<sup>12)</sup>。臨床的にわれわれは維持血液透析患者にAST-120を使用したところ、血中インドキシル硫酸、p-クレシル硫酸、フェニル硫酸が有意に減少するとともに、酸化ストレスマーカーである8イソプロスタン、酸化アルブミンが有意に低下した<sup>20)</sup>。以上から、吸着療法を現行の血液透析に加えることで蛋白結合性の高い尿毒症物質を効率的に除去し、CKD関連疾患を予防する可能性が考えられた。

今後はより効率的で臨床応用できる蛋白結合尿毒症物質の除去効率の高い治療法の開発が望まれる。CKD関連疾患の予防・治療として、吸着などにより除去効率を向上させる方法のほか、腸内フローラに介入した産生の低下、臓器障害をきたす細胞・組織それぞれとの反応抑制がターゲットとしてあげられ(図3)、これらを組み合わせることでCKD患者の予後、QOLが改善する可能性が拡がることと期待している。

## おわりに

尿毒症物質に着目したCKD関連疾患についてこれまでの研究成果を報告した。尿毒症物質はCKDの進行に伴い増加・蓄積し、さまざまなCKD関連疾患を引き起こすという共通項がありながら、蛋白結合能や立体構造の変化などそれぞれの特徴があり、病態の解明と治療法の開発には依然課題が多く、今後の進歩が望まれる。

## 謝辞

このたび平成28年度大島賞を受賞することができ大変光栄です。新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科 成田一衛教授をはじめとする多くの先生方に、これまで臨床および研究についてご指導いただき感謝申し上げます。大変ありがとうございました。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文献

1. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A, European Uremic Toxin Work, G. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23 (7) : 1258-1270.
2. Cheung AK, Rocco MV, Yan G, Leypoldt JK, Levin NW, Greene

- T, Agodoa L, Bailey J, Beck GJ, Clark W, Levey AS, Ornt DB, Schulman G, Schwab S, Teehan B, Eknoyan G. Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients ; results of the HEMO study. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 (2) : 546-555.
3. Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunitomo T, Kataoka H, Suzuki M, Hirasawa Y, Shirahama T, et al. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1985 ; 129 (3) : 701-706.
  4. Yamamoto S, Kazama JJ, Narita I, Naiki H, Gejyo F. Recent progress in understanding dialysis-related amyloidosis. *Bone* 2009 ; 45 Suppl 1 : S39-42.
  5. Naiki H, Okoshi T, Ozawa D, Yamaguchi I, Hasegawa K. Molecular pathogenesis of human amyloidosis ; Lessons from beta2-microglobulin-related amyloidosis. *Pathol Int* 2016 ; 66 (4) : 193-201.
  6. Yamaguchi I, Hasegawa K, Naiki H, Mitsu T, Matuo Y, Gejyo F. Extension of A beta2M amyloid fibrils with recombinant human beta2-microglobulin. *Amyloid* 2001 ; 8 (1) : 30-40.
  7. Yamamoto S, Yamaguchi I, Hasegawa K, Tsutsumi S, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 (1) : 126-133.
  8. Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 2004 ; 43 (34) : 11075-11082.
  9. Dou L, Sallee M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, Fallague K, Brunet P, Calaf R, Dussol B, Mallet B, Dignat-George F, Burtey S. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 (4) : 876-887.
  10. Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006 ; 69 (6) : 1081-1087.
  11. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009 ; 4 (10) : 1551-1558.
  12. Yamamoto S, Zuo Y, Ma J, Yancey PG, Hunley TE, Motojima M, Fogo AB, Linton MF, Fazio S, Ichikawa I, Kon V. Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates extent and instability of atherosclerosis accelerated by kidney disease in apolipoprotein E-deficient mice. *Nephrol Dial Transplant* 2011 ; 26 (8) : 2491-2497.
  13. Yamamoto S, Yancey PG, Zuo Y, Ma LJ, Kaseda R, Fogo AB, Ichikawa I, Linton MF, Fazio S, Kon V. Macrophage polarization by angiotensin II-type 1 receptor aggravates renal injury-acceleration of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 ; 31 (12) : 2856-2864.
  14. Yamamoto S, Zhong J, Yancey PG, Zuo Y, Linton MF, Fazio S, Yang H, Narita I, Kon V. Atherosclerosis following renal injury is ameliorated by pioglitazone and losartan via macrophage phenotype. *Atherosclerosis* 2015 ; 242 (1) : 56-64.
  15. Matsuo K, Yamamoto S, Wakamatsu T, Takahashi Y, Kawamura K, Kaneko Y, Goto S, Kazama JJ, Narita I. Increased proinflammatory cytokine production and decreased cholesterol efflux due to downregulation of ABCG1 in macrophages exposed to indoxyl sulfate. *Toxins (Basel)* 2015 ; 7 (8) : 3155-3166.
  16. Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler TA, Jerome WG, Kaseda R, Cox B, Bian A, Shintani A, Fogo AB, Linton MF, Fazio S, Kon V. Dysfunctional high-density lipoprotein in patients on chronic hemodialysis. *J Am Coll Cardiol* 2012 ; 60 (23) : 2372-2379.
  17. Yamamoto S, Narita I, Kotani K. The macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2016 ; 457 : 117-122.
  18. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem* 2012 ; 403 (7) : 1841-1850.
  19. Schulman G, Agarwal R, Acharya M, Berl T, Blumenthal S, Kopyt N. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of AST-120 (Kremezin) in patients with moderate to severe CKD. *Am J Kidney Dis* 2006 ; 47 (4) : 565-577.
  20. Yamamoto S, Kazama JJ, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Matsuo T, Watanabe H, Maruyama T, Narita I. Continuous reduction of protein-bound uraemic toxins with improved oxidative stress by using the oral charcoal adsorbent AST-120 in haemodialysis patients. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 14381.