

尿毒素インドキシル硫酸による血栓傾向の機序の解明

竹下享典

埼玉医科大学 総合医療センター 中央検査部

【研究の背景】

慢性腎臓病(以下 CKD)は、心血管疾患の危険因子であるが、血栓症発症の機序、予防に関する検討は進んでいない。腎機能低下とともに蓄積する、主要な尿毒素であるインドキシル硫酸は、血液透析をもってしても除去は困難であり、臓器障害を予防するためには、その下流での有害な細胞シグナルを抑制する必要がある。インドキシル硫酸は酸化ストレス・炎症などで臓器を傷害するため、動脈硬化のみならず血栓症との関連が予想される。我々はこれまでに拡張型心筋症、狭心症患者において、インドキシル硫酸の血中濃度が、動脈硬化の進行、生命予後の危険因子であることを報告した(Int J Cardiol. 2013, Am J Cardiol. 2013, Circ J.2013, 2014)。

【目 的】

慢性腎臓病において、血中に蓄積する主要な尿毒素・インドキシル硫酸は、腎障害のみならず心血管病を進行させ、予後を左右する。我々はインドキシル硫酸が虚血性心疾患、拡張型心筋症の予後を増悪することを報告した。本研究は検討をさらに進め、「尿毒素による血栓傾向の機序の解明」を目的に行った。ラット インドキシル硫酸負荷モデルにおける心血管の線維化、動脈硬化、石灰化の病理変化と凝固因子発現の変化、特に組織因子の発現の変化を検討した。インドキシル硫酸は OAT1,3 を介して細胞内に取り込まれ、アリルハイドロカーボン受容体(AhR)と NF- κ B の活性化や酸化ストレスの誘導など、多彩な炎症シグナルを活性化し、動脈硬化を進展させる。我々はダール食塩感受性ラットにインドキシル硫酸を負荷することでラット尿毒症モデルを確立した。病理所見は尿症患者者に類似した心筋の線維化、動脈硬化、血管石灰化、腎硬化像などを示し、CKD の合併症予防の治療標的はインドキシル硫酸であると確信するに至った。

我々はさまざまな循環器疾患モデルマウスの解析を手がけ、循環器疾患における組織因子、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の病的発現を検討してきた(Blood Coagul Fibrinolysis. 2016, Diabetes 2012)。本検討においては、基礎・臨床研究の結果をさらに推し進め、インドキシル硫酸が組織因子の発現を促進し、血栓傾向を増悪させるという仮説のもとに検討を行った。

【方 法】

1. ラット・インドキシル硫酸負荷モデルの作製し血栓傾向の解析

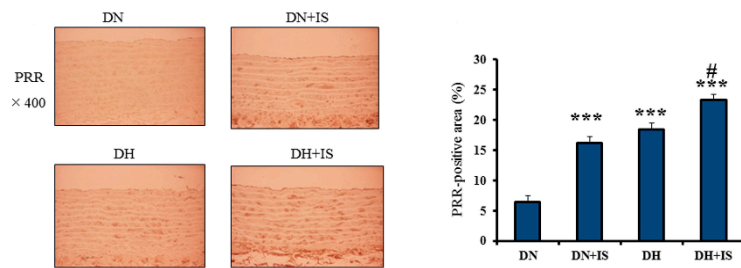
以下の本研究のプロトコールは当施設の動物実験委員会で承認済みである。

我々はダール食塩感受性ラットに食塩水とインドキシル硫酸を同時に32週間負荷することで、血中濃度が上昇し、尿毒症の表現型が現れることを確認している。体重、食餌量、尿、血液の生化学データ、血圧を4週間毎に32週間まで測定する。大動脈の病理組織をモデルの確立の評価もかねて解析する。大動脈における、炎症性と酸化ストレスマーカーの発現、外因系凝固因子である組織因子の発現を下記のように解析する。

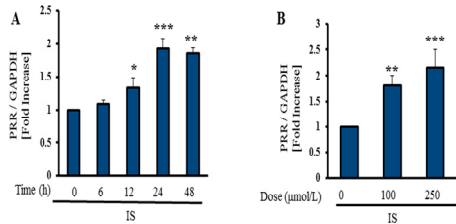
2. 培養血管平滑筋細胞におけるインドキシル硫酸による凝固因子誘導の機序の解析

炎症性サイトカインおよび酸化ストレスのシグナルは組織因子の発現を誘導することに着目し、培養ヒト大動脈平滑筋細胞にインドキシル硫酸を作用させ、プロレニン受容体カスケードの活性化を詳細に検討した。

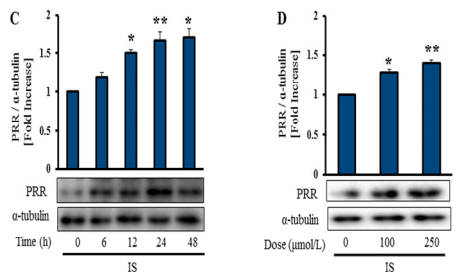
【結 果】



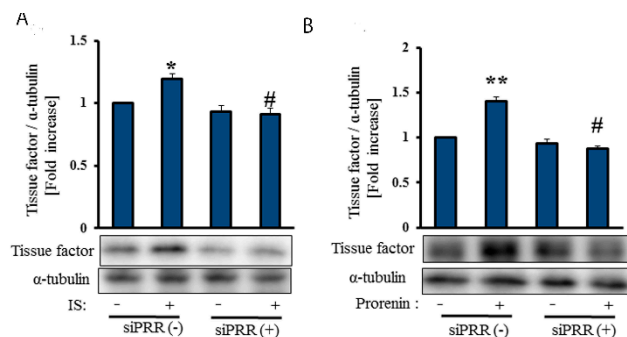
対照ラット(DN)、対照ラットにインドキシル硫酸を
負荷したもの(DN+IS) 高血圧発症ラット(DH) 尿毒
症モデルラット(DN+IS) 大動脈におけるプロレニン
受容体の発現を免疫組織染色で検討したところ、イ
ンドキシル硫酸は発現を増加させていた。



培養平滑筋にインドキシル硫酸を作用させたと、24時間をピークに濃度
依存性に RNA (A,B) 蛋白 (C,D) レベルでプロレニン受容体の発現は増加した。
(A,C はそれぞれ100micromol/l のインドキシル硫酸を6から48時間作用させ
た。B,D はそれぞれ24時間作用させた。)



培養平滑筋細胞にインドキシル硫酸(100micromol/l)を作用させインドキシル硫酸によるプロレニン受容体の発現を検討した。インドキシル硫酸によるプロレニン受容体の発現増加は抗酸化剤(NAC; A)、NADPH オキシダーゼ阻害薬(DPI; B)で抑制された。インドキシル硫酸を取り込むチャネル OAT3、インドキシル硫酸の細胞内受容体 AhR、炎症に重要な転写因子 NF-κB p65 を siRNA でノックダウンする系を確立した(C)。OAT3(D) AhR(E)、P65(F)をノックダウンするとインドキシル硫酸によるプロレニン受容体の発現増加は阻害された。



培養平滑筋細胞にプロレニン受容体の発現をノックダウンし
た後、インドキシル硫酸 (100micromol/l、A) とプロレニン
(20nanomol/l、B)を作用させて組織因子の発現の変化を検討
した。インドキシル硫酸とプロレニンは培養平滑筋において組
織因子の発現を増加させたが、プロレニン受容体をノックダウ
ンするとこれは抑制された。

以上より、次のように結論付けた。

インドキシル硫酸は酸化ストレス、NF-κB の活性化を介してプロレニン受容体の発現を増加させる。活性化したプロレニン受容体シグナルは組織因子を誘導し、血栓傾向を惹起する。

【考 察】

インドキシル硫酸は OAT3 を介して細胞内に取り込まれ、細胞内酸化ストレスを増加して細胞毒性がある。一方細胞内においては AhR 受容体と結合し、細胞増殖など様々な活性をもつことがわかっている。本検討では、インドキシル硫酸は、平滑筋細胞において酸化ストレスの産生、OAT3-AhR 受容体—NF- κ B カスケードの活性化を介して、プロレニンシグナルを活性化した結果、組織因子を誘導することを明らかにした。これまでインドキシル硫酸は酸化ストレスを産生した結果、直接 ERK1/2 を活性化して細胞増殖を惹起することが知られている。本検討では新しくプロレニン受容体シグナルがインドキシル硫酸による活性化する細胞シグナルであることを同定した。プロレニン受容体シグナルは、尿毒素・インドキシル硫酸による血栓傾向の新しい治療標的として酸化ストレス、NF- κ B カスケードと同様に注目される。我々は現在同モデルの解析で Notch 受容体の活性化による尿細管の線維化、インフラマゾーム活性化による組織炎症について解析を続けている (unpublished data)。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

慢性腎臓病(以下 CKD)は、心血管疾患、殊に血栓症の危険因子である。血栓症発症の機序として、インドキシル硫酸によるプロレニン受容体の活性化とそれによる血管平滑筋における組織因子の誘導をしめした。インドキシル硫酸による組織因子誘導の機序を明らかにすることは血栓症予防のための治療標的を明らかにできるものと考ええる。

【参考・引用文献】

Indoxyl sulfate-induced activation of (pro)renin receptor promotes cell proliferation and tissue factor expression in vascular smooth muscle cells.

Yisireyili M, Saito S, Abudureyimu S, Adelibieke Y, Ng HY, Nishijima F, Takeshita K, Murohara T, Niwa T. PLoS One. 2014 Oct 24;9(10):e109268. doi: 10.1371/journal.pone.0109268. eCollection 2014.