

慢性腎臓病における腸内細菌叢の乱れが Trimethylamine-N-oxide (TMAO) の増加を介して血管石灰化およびサルコペニアを引き起こす機序の解明

山田俊輔

九州大学病院腎・高血圧・脳血管内科

key words : TMAO, 腸内細菌叢, 血管石灰化, 慢性腎臓病

要 旨

血管石灰化は慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) 患者の心血管合併症の原因として、極めて重要である。CKD 患者は健常人と比べて便秘の頻度が高く、腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) を合併する率が高いことが報告されている。近年、dysbiosis に伴って血中の trimethylamine-N-oxide (TMAO) が増加し、TMAO が動脈硬化を促進して心血管合併症の発症率を増加させることが基礎実験およびコホート研究によって実証された。我々は CKD 患者の血管石灰化の一因に、dysbiosis に伴う TMAO の増加が関係しているという仮説を立てた。まず、アデニン腎症モデルをマウスに適応するためにアデニン含有餌の組成を改良し、CKD の進行に伴って6~8週間で高度の血管石灰化とサルコペニアを同時に発症するマウスモデルを完成させた。本モデルでは便硬度が上昇することも確認した。さらに、血中の TMAO やインドキシル硫酸などの尿毒素物質を測定するために、血液を採取した。培養血管平滑筋細胞を用いた実験系において、TMAO を負荷するとリンによる細胞外マトリックスの石灰化が促進されることを明らかにし、さらに、マウスから摘出した胸部大動脈をリング状に裁断して石灰化培地で培養した場合にも、TMAO を投与すると大動脈リングへの石灰沈着量が増加した。今後、今回開発した CKD モデルにおいて、血中の TMAO が増加していることを確認するとともに、下剤を投与して便秘や腸内細菌叢の乱れを改善した場合に血中の TMAO の濃度が低

下し、さらに血管石灰化の進行やサルコペニアの進展を抑制できるかどうかを検証する。

緒 言

血管石灰化は、慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) 患者の心血管合併症の原因として非常に重要である¹⁾。これまでの研究により、リン負荷、カルシウム (Ca) 負荷、二次性副甲状腺機能亢進症、炎症、酸化ストレス、低栄養など、実に多彩な原因が CKD 患者の血管石灰化を促進することが知られている^{2~4)}。中でもリン負荷が血管石灰化に及ぼす影響は非常に大きい。過剰なリン負荷は、血管の中膜層において血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞へ変化させ、アポトーシスを誘導し、細胞外マトリックスを分解するなど、実に多様な経路を促進することで、血管石灰化を多面的に促進することが明らかになっている⁵⁾。このため、CKD 患者においてリン負荷を低減することが重要な治療戦略になると理解され、日常臨床で実践されてきた。しかし、リンを厳格に管理するだけでは血管石灰化の進展を完全に抑制することはできず、血管石灰化の危険因子を多面的に制御することの重要性が示唆される。

近年、食事に含まれるコリンやL-カルニチンが腸内細菌叢によって代謝を受け、最終的に trimethylamine-N-oxide (TMAO) と呼ばれる代謝産物に変化して、この TMAO が動脈硬化を促進することが明らかになった⁶⁾。TMAO は腸内細菌叢によって生成されるため、近年 CKD 患者でも注目されている便秘や腸

内細菌叢の乱れ (dysbiosis) によって血中の TMAO 濃度が上昇する可能性が指摘されていた⁷⁾。事実、臨床研究において、CKD 患者では血中の TMAO 濃度が上昇することが報告されている⁸⁾。TMAO はインドキシル硫酸や P-クレジル硫酸と並んで腸内細菌叢がその産生に関与する尿毒症物質と位置付けられる。これまでの基礎研究の結果に基づけば、インドキシル硫酸や P-クレジル硫酸などの尿毒素物質は CKD に合併する血管石灰化を促進することが示されている⁹⁾。しかし、TMAO と血管石灰化に関する研究は未だ十分になされていない。

今回我々は、日本透析医会の公募研究助成を受け、以下の2点を達成することを目的に実験を行った。第1の目的は、腎機能障害の進行に沿って、腸内細菌叢の乱れ、便秘、サルコペニア、血管石灰化を呈する CKD マウスモデルを確立すること、第2の目的は、尿毒素物質である TMAO が培養血管平滑筋細胞およびマウス大動脈リングに直接作用して、細胞外マトリックスの石灰沈着 (= 血管石灰化) を促進することを明らかにすることである。

研究計画書の策定時点では、CKD マウスモデルに下剤 (ルビプロストンやリナクロチドなど) を混餌して投薬し、血管石灰化が改善するかどうかまで確認する予定であったが、研究の進捗状況が初期計画よりも遅れており、下剤の効果検証については今回の報告には含まれていないことをご了承いただきたい。

1 対象と方法

1-1 動物実験

CKD の誘導方法は、ラットの CKD モデルとして既に確立されているアデニン腎症モデルを使用した。アデニン腎症モデルの原法は、0.75% のアデニンを含有した餌を 4~8 週間程度ラットに給餌する。本モデルは進行性かつ高度の腎障害を惹起するラットの CKD モデルとして確立されてきた。近年、本法のマウスへの応用が急速に普及しつつある。我々は、予備実験を行い、餌中のアデニン濃度が 0.1~0.3% の範囲では、0.2% のアデニン含有餌が最も安定して高度の CKD を誘導できることを確認し、0.2% アデニン含有餌を今回の腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) と血管石灰化およびサルコペニアが進行するモデルとして採用した。普通餌は日本クレア社の CE-2 を使用した。今回の実験

に用いるアデニン含有餌には、アデニン 0.2% の他、餌中の最終濃度が Ca 1.0%, 無機リン 1.2%, 蛋白 9.5%, ラクトース 20% になるように調整した。さらに、CKD をより急速に進行させることを目的に、アデニン含有餌の給餌を開始する 1 週間前に、全身麻酔下で左腎摘出術を追加した。給餌を開始して 8 週の時点でマウスを安楽死させた。安楽死に際して、心臓から採血を行うとともに、大腿骨、腓腹筋とヒラメ筋、大動脈弓から腹部大動脈までを一体として摘出した。なお、安楽死の 1 日前にマウス用代謝ゲージを用いて尿および便を採取した。

採取血液を用いて、血液中のアルブミン濃度、クレアチニン濃度、Ca 濃度、リン濃度、intact parathyroid hormone (PTH) 濃度、fibroblast growth factor 23 (FGF23) 濃度などを測定した。腎臓はマッソントリクローム染色で線維化の程度を半定量的に評価した。腹部大動脈はアリザリンレッド染色を行って血管石灰化の有無、分布、程度を半定量的に評価した。また、大動脈弓部のサンプルを用いて大動脈中の Ca 含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重量) を測定し、血管石灰化の程度を定量的に評価した。本実験においては、コントロールマウス (control; CNT) 群として、全身麻酔下で偽手術を行ったマウスにアデニンを含有しない通常餌 (日本クレア社、CE-2) を給餌する群を並列飼育した。CNT 群と CKD 群のマウスは、いずれも 8 週間飼育したのちに安楽死させた。CNT 群と CKD 群の比較において、統計学的な有意差は $P < 0.05$ に設定した。

1-2 培養血管平滑筋細胞実験 (in vitro)

ラットの培養血管平滑筋細胞である A7r5 細胞を購入して、今回の実験では使用した。3~8 継代の培養細胞を本実験では使用した。培地中の無機リン濃度は 3.5 mM, Ca 濃度は 2.5 mM, fetal bovine serum (FBS) の濃度は 10% とした。コントロールの培地は、無機リン濃度は 1.0 mM, Ca 濃度は 1.0 mM, FBS の濃度は 10% とした。TMAO の培地中の濃度は、既報に従い、培地中の最終濃度が 100 μM になるよう調整した。細胞外マトリックスの石灰化を誘導するためのリン負荷期間は 7~10 日とした。培養細胞を Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後に 0.6N の塩酸で 24 時間処理し、Ca 沈着量を測定した。また NaOH で処理した後に蛋白含量も定量し、石灰沈着量は Ca 含量

/蛋白量比として計算した。

1-3 マウス胸部大動脈リングの培養細胞実験 (*ex vitro*)

8週齢の C57BL6/J マウスから吸入麻酔下において胸部大動脈を無菌的に摘出し、*ex vivo* の実験系に用いた。大動脈を摘出したマウスは安楽死を適用した。摘出した胸部大動脈は周囲の脂肪組織を愛護的に除去した後、リング状に分節し、マウス大動脈リングとして高リン培地で無菌的に7~10日間培養した。培地中の無機リン濃度は3.5 mM, Ca濃度は2.5 mM, FBSの濃度は10%とした。コントロールの培地は、無機リン濃度は1.0 mM, Ca濃度は1.0 mM, FBSの濃度は10%とした。TMAOの培地中の濃度は、既報に従い、培地中の最終濃度が100 μ Mになるよう調整した。培養液中で培養したマウス胸部大動脈リングを回収し、動脈の乾燥重量を測定後に6Nの塩酸で動脈を処理して総Ca含量を測定し、血管壁に沈着したCa量を定量的に評価した。

2 結果

2-1 動物実験

CKD群ではCNT群と比較して、アデニン餌の給餌開始後4週目から血清のシスタチンC濃度が進行性に有意に ($P<0.05$) 上昇し、4週目から血清リン濃

度が有意に ($P<0.05$) 上昇した。また、腎機能正常のCNT群と比較して、CKD群においては血清 intact PTH 濃度や血清 FGF23 濃度は8週目において有意に ($P<0.05$) 高値であった。CKD群における腎臓の間質線維化は2週目から進行し、8週目で高度になることをマッソントリクローム染色で確認した。腹部大動脈組織のアリザリンレッド染色においては、4週目から大動脈中膜に血管石灰化を認めるようになり、8週目には全周性の高度の血管石灰化を認めた。単位重量当たりの大動脈Ca含量は4週目から有意に ($P<0.05$) 上昇した。大動脈組織のPCRでは、平滑筋細胞形質の喪失と骨芽細胞様細胞の形質獲得を示す結果を認めた。また、小動物用マイクロCTで撮影した大腿骨の骨量は8週目の時点でCKD群において有意に ($P<0.05$) 減少した。その変化は特に皮質骨において大きかった。さらに、サルコペニアの評価としてのヒラメ筋および腓腹筋の骨格筋重量は、アデニン餌給餌後2週目から有意に ($P<0.05$) 減少し、筋肉量の減少は8週目まで持続した。また、CKDの骨格筋線維径はCNT群と比較して有意に ($P<0.05$) 細小化していた。CKD群の腓腹筋における myokine の遺伝子発現状況についてPCRで検討したところ、CNT群と比較して様々な遺伝子の発現が大きく変化していることが明らかになった。さらに、骨格筋の減少量と血管石灰化の

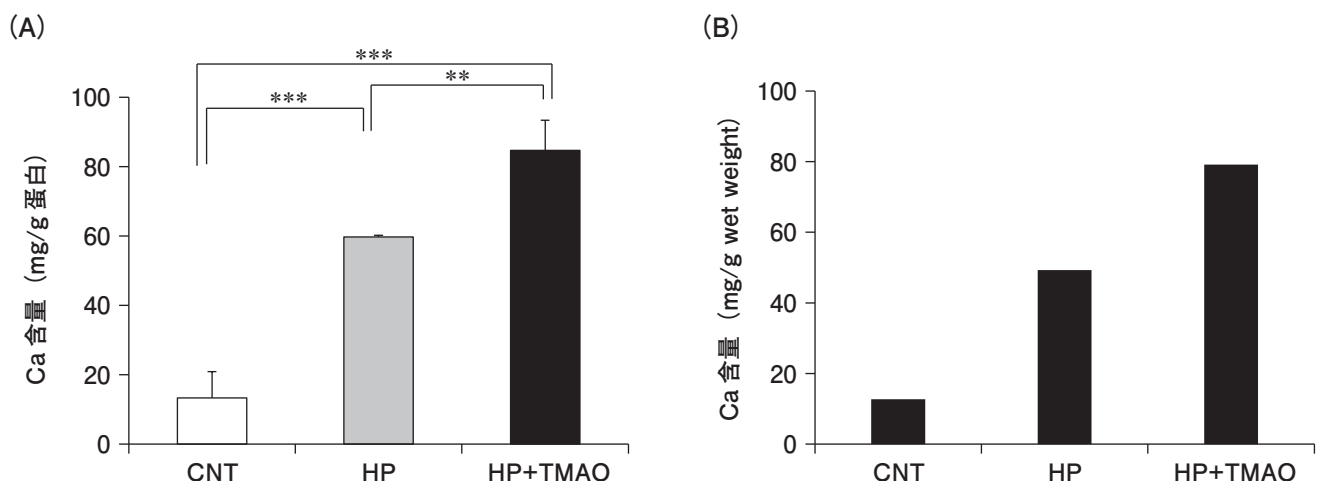


図1 培養血管平滑筋細胞 (*in vitro*) およびマウス摘出大動脈リング (*ex vivo*) において TMAO 投与が無機リン負荷による石灰沈着量に及ぼす影響の影響

(A) 培養血管平滑筋細胞 (各群 n=3). (B) マウス摘出大動脈リング (各群 n=2).

リン負荷による培養血管平滑筋細胞およびマウス摘出大動脈のCa沈着量は、TMAO 100 μ Mの負荷によって有意に増強された。培地中の無機リン濃度は3.5 mM, Ca濃度は2.5 mM, FBS濃度は10%とした。棒グラフのデータは平均値+標準偏差で表記した。 $P<0.05$ を統計学的に有意と判定した。** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Ca, カルシウム; CNT, コントロール群; HP, 高リン群; HP+TMAO, 高リン+TMAO群. TMAO, trimethylamine-N-oxide.

程度はともに腎機能と負の相関関係を示した。CNT 群の同週齢のマウスと比較して、アデニン餌を給餌した CKD マウスの便の硬度は高値であった。

2-2 培養細胞実験 (*in vitro*)

培養血管平滑筋細胞にリンを負荷すると、細胞外マトリックスへの Ca 沈着が有意に ($P<0.05$) 増加した。また、リンを負荷した培地においては、アリザリンレッド染色において、石灰沈着を可視化できた。PCR による遺伝子発現量の評価においては、リン負荷により α SMA の遺伝子発現が低下し、BMP2 など骨芽細胞様細胞への形質変化を示唆する遺伝子の mRNA 発現量が増加した。リン負荷による培養血管平滑筋細胞周囲の細胞外マトリックスへの Ca 沈着量は、TMAO 100 μ M 負荷によって有意に ($P<0.05$) 増強された (図 1 (A))。

2-3 培養細胞実験 (*ex vitro*)

マウス胸部大動脈リングを無菌的に培養液中で培養した場合、無機リンを負荷すると、大動脈リングへの Ca 沈着量が有意に ($P<0.05$) 増加し、アリザリンレッド染色において大動脈リングへの石灰沈着を確認した。リン負荷によるマウス胸部大動脈リングへの Ca 沈着量は、TMAO 100 μ M 負荷によって有意に ($P<0.05$) 増強された (図 1 (B))。

3 考 察

本研究の成果として、第 1 に、CKD の進行に伴って便秘傾向になり、骨量と骨格筋量が減少し、さらに血管石灰化が高度に進展するマウスモデルを確立したことである。第 2 に、CKD で上昇するとされる TMAO が、血管壁や血管平滑筋細胞に直接作用して血管石灰化を促進することが、*in vitro* および *ex vivo* の実験によって実証できたことである。

TMAO は、近年注目を集めている尿毒症物質のひとつである。TMAO は、インドキシル硫酸や P-クレジル硫酸と並んで、CKD の様々な病態に関与している可能性があり、臨床研究や基礎研究によって TMAO の尿毒症物質としての負の側面の詳細が、今後ますます明らかになるであろう。

インドキシル硫酸、そして P-クレジル硫酸と血管石灰化との関係は以前から基礎実験によって実証されて

いる。例えば、インドキシル硫酸は、培養血管平滑筋細胞に発現している OAT-1 や OTA-3 を介して細胞内に取り込まれ、NADPH oxidase の発現上昇を介して酸化ストレスを亢進させ、血管平滑筋細胞から骨芽細胞様細胞への形質変化を起こすことで血管石灰化を促進することが、培養細胞を用いた実験によって報告されている¹⁰⁾。また、動物実験においても、インドキシル硫酸と P-クレジル硫酸は、糖代謝異常を介して血管石灰化を促進することが、培養細胞実験および動物実験で明らかにされた⁹⁾。TMAO に関しても血管石灰化への関与を示唆する結果が近年発表された¹¹⁾。Zhang らは、*in vitro* および *ex vivo* の実験系において、TMAO の投与は培養血管平滑筋細胞および大動脈リングの石灰化プロセスを促進したと報告している。さらに彼らは、CKD マウスに抗菌薬を投与して腸内細菌叢を死滅させた場合、血中の TMAO 濃度が減少するとともに、血管石灰化が軽減されることを報告している。これらの結果を総合すると、CKD で上昇する TMAO は血管石灰化を促進する可能性があり、TMAO を含めた尿毒素物質の除去が、血管石灰化の進展抑制に貢献できる可能性が示唆される。我々は、今回開発した CKD マウスに各種下剤を投与することによって腸内細菌叢にアプローチし、腸内細菌叢がその産生に関わっているとされる TMAO などの尿毒素物質の体内産生量を減少させ、血管石灰化を含めて CKD の臓器合併症を軽減できるのかどうかについての検証実験を現在行っている。下剤の使用によって腸内細菌叢の乱れを調節でき、さらにその結果 TMAO などの尿毒素物質の産生を低下させることができれば、血管石灰化などの CKD 患者に合併する臓器障害を低減できることが期待される。

結 論

CKD 患者では便秘などを介して腸内細菌叢が乱れ、その結果上昇する TMAO が CKD に伴う血管石灰化を促進している可能性が示唆された。今後、今回開発したマウスモデルの血中 TMAO 濃度が上昇しているかどうかを確認し、さらに、ルビプロストンなどの下剤を本マウスモデルに投与した場合に、血管石灰化やサルコペニアが改善するかどうかを検証する実験が必要である。また、TMAO を培養骨格筋細胞に負荷した場合の骨格筋細胞への影響を確認する作業が必要で

ある。

本研究は令和元年度日本透析医学会公募研究助成などによって行われ、成果の一部は原著論文として既に英文誌に掲載されている (Arase H, et al. : Protective Roles of Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1 (XPR1) in Uremic Vascular Calcification. *Calcif Tissue Int* in press. PMID: 35112184. DOI: 10.1007/s00223-022-00947-3). また成果の一部は英文誌に今後投稿する予定であり、二重投稿を避けるために研究結果の概要を総説的に記載するにとどめた。

利益相反自己申告：開示すべきものなし

文 献

- 1) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al. : Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38 : 938-942.
- 2) Yamada S, Giachelli CM : Vascular calcification in CKD-MBD : Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone* 2017; 100 : 87-93.
- 3) Paloi NJ, Giachelli CM : A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307 : F891-F900.
- 4) Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, et al. : The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats : important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 2012; 27 : 474-485.
- 5) Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, et al. : Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306 : F1418-F1428.
- 6) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. : Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472 : 57-63.
- 7) Sumida K, Lau WL, Kovesdy CP, et al. : Microbiome modulation as a novel therapeutic approach in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2021; 30 : 75-84.
- 8) Xu KY, Xia GH, Lu JQ, et al. : Impaired renal function and dysbiosis of gut microbiota contribute to increased trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease patients. *Sci Rep* 2017; 7 : 1445.
- 9) Opdebeeck B, Maudsley S, Azmi A, et al. : Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate Promote Vascular Calcification and Associate with Glucose Intolerance. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30 : 751-766.
- 10) Adijiang A, Goto S, Uramoto S, et al. : Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 : 1892-1901.
- 11) Zhang X, Li Y, Yang P, et al. : Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40 : 751-765.