

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08428

研究課題名(和文)腎不全に合併する心血管疾患への高ホモシステイン血症の関与

研究課題名(英文)Effect of hyperhomocysteinemia on the cardiovascular disease in renal failure

研究代表者

長谷川 弘 (HASEGAWA, Hiroshi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80218453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全は、それ自身が心血管疾患の危険因子であるが、心血管疾患の危険因子である高ホモシステイン血症を合併する。腎不全に高ホモシステイン血症が合併したとき、メチオニン-ホモシステイン代謝系に認める変化及び血管系への影響を明らかにすることを目的に、メチオニン強化食で飼育することにより高ホモシステイン血症を合併させた腎不全ラットを用い、薬理的解析及び代謝フラックス解析を施行した。その結果、腎不全に高 Hcy 血症が合併した状態が持続すると、血管平滑筋にまで及ぶ血管弛緩障害を起すこと、メチオニン-ホモシステイン代謝系全体の代謝フラックスが低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腎不全と高ホモシステイン血症を合併したモデルを作出し、その病態解析を行った初めての例である。両者が合併すると腎不全のみに比べて血管障害が増悪すること、メチオニン-ホモシステイン代謝系全体の代謝回転が低下することが明らかになった。末期腎不全患者の主要な死因の一つに心血管疾患が挙げられるが、バイオマーカーとしてホモシステインの血漿濃度を測定してリスク評価すること、末期腎不全患者が高ホモシステイン血症が合併しないような対策をとることが重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasma homocysteine is elevated in patients with impaired renal function, and markedly so at end-stage renal disease. As chronic kidney disease and hyperhomocysteinemia are also independent risk factors for cardiovascular disease, the latter is hypothesized to accelerate vascular abnormalities following renal failure. This study aimed to investigate the combined effect of impaired renal function and hyperhomocysteinemia on vascular function and homocysteine metabolic flux. We show that in 5/6-nephrectomized rats, a model of chronic kidney disease, a methionine-rich diet for 8 weeks induces moderate hyperhomocysteinemia, exacerbates hypertension, and impair endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation. In addition, we found the metabolic flux of the methionine-homocysteine pathways was reduced in 5/6-nephrectomized rats with hyperhomocysteinemia.

研究分野：代謝生化学

キーワード：ホモシステイン メチオニン 腎不全 心血管疾患 代謝フラックス 安定同位体 血管平滑筋 GC-MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎不全は心血管疾患の合併頻度の高い病態である。メチオニン (Met) の代謝物であるホモシステイン (Hcy) の血漿濃度が基準値よりも高く維持された状態 (高 Hcy 血症: 15 μ M 以上) は、心血管疾患の危険因子の一つである。腎機能が低下すると Hcy の血漿濃度が高値を示すことから、腎不全患者における心血管疾患発症・進展への高 Hcy 血症の関与が指摘されている。申請者らが保存期腎不全患者や透析患者を対象として行った調査では、糸球体ろ過量が 30mL/min 以下に低下すると Hcy の血漿濃度が上昇すること、透析患者では中等度 (30 μ M) 以上の高 Hcy 血症を呈すること、Hcy は化学構造、物理化学的性質ともに酷似しているシステインに比べて透析による除去率が低く、透析を施行してもその血漿濃度は基準値まで低下しないこと等の結果を得ている。しかし、腎機能低下に伴って何故 Hcy の血漿濃度が上昇するのか、その上昇がどのような機序で心血管疾患の発症・進展に関わっているかは不明である。

2. 研究の目的

腎不全と高ホモシステイン血症が合併したときの、Met-Hcy 代謝系に認める変化および血管障害機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの検討で、慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘除 (Nx) ラットを長期間飼育しても高 Hcy 血症を合併しないことが明らかになっている。本研究では、Nx ラットを Met 強化食で飼育して作出した腎不全と高 Hcy 血症の合併モデルラットを用い、

- (1) 胸部大動脈の血管作動薬に対する応答性の薬理的評価
- (2) 安定同位体標識体を用いた Met-Hcy 代謝フラックス解析を検討した。

(1) 胸部大動脈の血管作動薬に対する応答性の薬理的評価

6 週令ラットの左腎 2/3 を摘除した。1 週後に右腎を全摘除した。腎摘除量は体重をもとに求め、およそ 70-75% 腎摘除 (Nx) ラットを作出した。同様に、偽手術 (sham) ラットを作出した。Nx ラット及び Sham ラットをそれぞれ 2 群にわけ、術後 2 週目より 2% Met 強化食 (Met) あるいは基礎食 (Ctl) で飼育した (計 4 群: Nx-Met; Nx-Ctl; Sham-Met; Sham-Ctl)。経過的に、tail-cuff 法により血圧を測定した。特殊食での飼育開始後 8 週目に、全血採血後、胸部大動脈を摘出し、マグヌス法を用いて、血管に作用する薬物に対する反応性を観察した。

(2) 代謝フラックス解析

Met 強化食あるいは基礎食で飼育した Nx ラット及び Sham ラットに、 $[^2\text{H}_7]$ Met 及び $[^2\text{H}_8]$ Hc-Hcy をそれぞれ個別に急速静脈内投与 + 持続静脈内投与し、経時採血した。血漿に既知量の $[^{13}\text{C}]$ Met 及び $[^{13}\text{C}_2]$ Hcy-Hcy を内標準として加え、ジチオトレイトールによるジスルフィド結合の還元、トリクロロ酢酸による除タンパク、BonElut SCX 陽イオン交換樹脂カラムによる精製、水-エタノール-ピリジン存在下イソブチルクロロフォホルメートによる誘導化を経て、生成した $[^2\text{H}_7]$ Met、 $[^2\text{H}_4]$ Met、Met、 $[^2\text{H}_4]$ Hcy 及び Hcy の N(0,S)-isobutyloxy carbonyl ethyl ester (IBC-Et) 誘導体を GC-MS-SIM で測定し、 $[^2\text{H}_7]$ Met、 $[^2\text{H}_4]$ Met、Met、 $[^2\text{H}_4]$ Hcy 及び Hcy の血漿濃度を測定した。これらの値を用いて、標識体と非標識体の総和に占める標識体の割合、すなわち Enrichment を算出した。 $[^2\text{H}_7]$ Met、 $[^2\text{H}_4]$ Met 及び $[^2\text{H}_4]$ Hcy の Enrichment (それぞれ E_{M7} 、 E_{M4} 、 E_{H4} とする) の時間推移をもとに、それらがプラト-に達したときの値を求めて、脱メチル化代謝回転速度 (DM)、再メチル化代謝回転速度経路 (RM) 及びバイオ転移代謝回転速度 (TS) を算出した。

4. 研究成果

(1) 胸部大動脈の血管作動薬に対する応答性の薬理的評価

Nx ラットを 5/6 腎摘除後 10 週間飼育することで、Sham ラットに比べて血漿クレアチニン及び BUN の有意な上昇とタンパク質の尿中排泄率増加を認めたが、Met 負荷の有無による差は認められなかった。Nx+Met 群及び Nx+Ctl 群では術後それぞれ 3、4 週で収縮期血圧 (SBP) の有意な上昇が観察され、その後徐々に上昇した。Sham+Met 群の SBP は Met 負荷開始後 3 週で Sham+Ctl 群に比べて有意に高値を示し、その後ほぼ一定に推移した。

Sham+Met 群と Sham+Ctl 群にはアセチルコリンによる内皮依存的な弛緩反応性に差が認められないのに対して、Nx+Ctl 群はそれらの 2 群に比べて有意に弛緩性が低下した。さらに、Nx+Met 群は Nx+Ctl 群に比べて弛緩性が低下した。ニトロプルシッドナトリウムによる内皮非依存的血管弛緩反応は Nx+Met 群で Sham 群に比べて有意に減弱したものの、最大弛緩反応には影響しなかった。さらに、8-Br-cGMP による protein kinase G (PKG) を介した弛緩反応及びイソプレナリンによる cAMP-PKA を介した弛緩反応も Nx+Met 群で Sham 群に比べて有意に減弱した。

以上の結果から、Nx によって内皮依存的な血管弛緩性が減弱すること、軽度~中等度の高 Hcy 血症が合併することによって血管平滑筋にまで弛緩障害が及ぶことが明らかになった。今後、その障害機序について検討する必要がある。

(2) 代謝フラックス解析

Sham+Met 群の血漿 Met 濃度を測定(62.1 ± 18.0 nmol/mL)したところ、摂餌前(46.2 ± 11.6 nmol/mL)に比べて有意に上昇した。しかし、そのラットを一晩絶食させると、血漿 Met 濃度(44.5 ± 8.5 nmol/mL)は摂餌前と同じくらいまで低下した。Nx+Met 群の血漿 Met 濃度も Met 強化食により摂餌前(36.0 ± 4.6 nmol/mL)に比べて有意に上昇した(51.8 ± 28.6 nmol/mL)。その後絶食により血漿 Met 濃度は低下したものの摂餌前に比べて有意に高値であった。健常ラット、Nx ラットに $[^2\text{H}_7]$ Met を静脈内単回投与したときの半減期はそれぞれ約 1 hr、約 2 hr であることから、一晩の絶食により過量に摂取した Met が絶食中に代謝されたと考えられた。

Sham+Met 群の血漿 Hcy 濃度は、Met 強化食摂餌前(7.0 ± 1.2 nmol/mL)に比べて摂餌により有意に上昇した(10.8 ± 10.5 nmol/mL)。その後、16 時間絶食すると摂餌前と同じくらい(6.8 ± 1.7 nmol/mL)まで低下した。摂餌開始時、すなわち 5/6 腎摘除後 2 週の時点で、Nx ラットの血漿 Hcy 濃度(9.6 ± 2.5 nmol/mL)は Sham ラットに比べて有意に高値だった。このラットを Met 強化食で飼育すると、血漿 Hcy 濃度は摂餌前に比べて有意に上昇した(15.4 ± 5.8 nmol/mL)。この値は、ヒトの軽度高 Hcy 血症に相当する濃度であった。このことから、摂餌により目的とする高 Hcy 血症モデルを作出できたと判断した。これらのラットを一晩絶食すると血漿 Hcy 濃度は著明に低下し、摂餌前よりも低値(7.1 ± 1.7 nmol/mL)を示す傾向にあった。

これらのラットに対して Met-Hcy 代謝フラックス解析を施行した。DM 及び RM を、5/6 腎摘除の有無(Nx と Sham)及び Met 強化食摂餌(Met と Ctl)の有無の 2 因子に対する 2-way factorial ANOVA を用いて解析した。その結果、DM は Met 強化食摂餌によって有意に低下した。また、統計的に有意ではないが、Met 強化食摂餌と 5/6 腎摘除との間に相乗的な傾向があった。そこで、5/6 腎摘除の有無と Met 強化食摂餌の有無によって 4 群にわけ post-hoc test として Tukey 法を用いた one-way ANOVA 解析をしたところ、Sham+Ctl 群と Sham+Met 群の DM には差異は認められない(116 ± 19 $\mu\text{mol/hr/kg}$ vs 103 ± 23 $\mu\text{mol/hr/kg}$; $p=0.4269$)が、Nx+Met 群の DM (82 ± 7 $\mu\text{mol/hr/kg}$)は Sham+Ctl 群($p=0.0074$)、Sham+Met 群 ($P=0.0019$)に比べて有意に低かった。

1% Met 強化食で 12 週間飼育したとき、S-adenosylhomocysteine (SAH) の血漿濃度は普通食で飼育したときよりも有意に高値であったと報告されている。今回の実験では、SAH の血漿濃度はまだ測定できていないが、この報告と同様に SAH の血漿濃度が高くなっていると考えた。SAH の過剰は S-adenosylmethionine (SAM) によるメチル基転移反応に対して生成物阻害をおこすと考えられる。SAM を合成する酵素は肝臓で強く発現していること、SAM を基質とする methyltransferase は様々な臓器に広く分布していること、S-adenosylhomocysteine hydrolase は様々な臓器に発現しているが、肝臓での活性が強いことが知られている。このように脱メチル化経路に関わる酵素の発現や活性が肝臓に強いことから、5/6 腎摘除だけでは差異が認められなかった DM が Met 強化食によりメチル基転移反応が阻害され、低下したことが示唆された。

RM は Met 強化食摂餌と 5/6 腎摘除のいずれでも有意に低下し、その作用は相加的であった。再メチル化反応に働く酵素である BHMT と MS のうち、BHMT はヒトでは肝臓、腎臓、脾臓に分布しているが、ラットでは肝臓に局在化しており、肝特異的と報告されている。一方、MS はラットにおいて様々な臓器に分布しているが、腎臓での活性が肝臓の 4 倍といわれている。そのため、5/6 腎摘除による MS の減少により RM が低下したと考えられる。さらに、Met 強化食を持続的に摂餌していることで、再メチル化反応が抑制されたと考えられた。

TS は有意差検定ができないため明確なことはいえないが、Met 強化食により低下する傾向にあることが示唆された。

以上の結果から、Nx ラットを 2%Met 強化食で飼育することで作出した高 Hcy 血症合併腎不全ラットでは、Met-Hcy 代謝系全体の代謝フラックスが低下していることを見出すことができた。

腎不全に高 Hcy 血症が合併したときに、血管に与える影響をマグヌス法により、Met-Hcy 代謝系に与える影響を安定同位体標識体投与による代謝フラックス法により検討した。その結果、Met 強化食で飼育した健常ラットや基礎食で飼育した Nx ラットでは認められない血管平滑筋弛緩障害が高 Hcy 血症合併 Nx ラットで観察され、腎不全に高 Hcy 血症が合併した状態が持続すると、血管障害を増悪することが明らかになった。また、Met-Hcy 代謝系全体に及ぶ代謝能が低下することを示唆する知見も得られた。本研究では Met 強化食で飼育することで高 Hcy 血症を作出したが、当然ではあるが高 Met 血症も合併した。そのため、得られた知見が、高 Hcy 血症を合併したためなのか、高 Met 血症を合併したためなのかを明確にすることができなかった。今後、Hcy 強化食あるいは Hcy-Hcy 強化食で飼育し、高 Hcy 血症のみ合併した腎不全モデルでの検討を重ね、本成果の妥当性を評価していきたい。また、腎機能低下に伴って経日的に Hcy の血漿濃度が上昇するモデルを作出し、腎機能低下に伴う高 Hcy 血症の成因機構を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lei Li, Hiroshi Hasegawa, Niro Inaba, Wataru Yoshioka, Dennis Cahng, JianXun Liu, Kimiyoshi Ichida	4. 巻 50
2. 論文標題 Diet-induced hyperhomocysteinemia impairs vasodilation in 5/6-nephrectomized rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 1485-1494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-018-2626-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroshi Hasegawa, Nami Masuda, Hiromi Natori, Yoshihiko Shinohara, Kimiyoshi Ichida	4. 巻 162
2. 論文標題 Pharmacokinetics and toxicokinetics of D-serine in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 264-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2018.09.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 弘
2. 発表標題 GC-MSとMosher試薬を用いたDL-アミノ酸の分別定量
3. 学会等名 第79回分析化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 弘、田村優香、重永恵理、松尾和恵、飯塚さやか、篠原佳彦、市田公美
2. 発表標題 GC-MSによる重水素標識及び非標識メチオニン及びホモシステイン測定法の開発とその生体内動態研究への応用
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第9回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 弘、篠原佳彦、副島昭典、市田公美
2. 発表標題 血液透析による血中ホモシステイン、システインの変動
3. 学会等名 日本アミノ酸学会12回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 弘, 篠原 佳彦, 市田 公美
2. 発表標題 GC-MSを検出手段とする安定同位体希釈分析法とMosher試薬を用いたDL-アミノ酸の分別定量
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川 翔, 廣野 真帆, 長谷川 弘, 市田 公美
2. 発表標題 Goto-Kakizaki糖尿病モデルラットにおけるメチオニン-ホモシステイン代謝系の代謝フラックス解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	市田 公美	東京薬科大学・薬学部・教授	
	(ICHIDA Kimiyoshi)		
	(80183169)	(32659)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	吉岡 亘 (YOSHIOKA Wataru) (80425496)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	