

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07188

研究課題名(和文)慢性腎不全における高ホモシステイン血症の成因機序とその心血管疾患発症への関与

研究課題名(英文) Mechanism of hyperhomocysteinemia in chronic renal failure and its involvement in the development of cardiovascular disease

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全は心血管疾患の合併頻度の高い病態である。腎機能が低下すると心血管疾患の危険因子であるホモシステイン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・進展への高ホモシステイン血症の関与が指摘されている。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の代謝回転にどのような変化が起きるかを明らかにすることを目的に、ホモシステイン添加食で飼育することで作出した高ホモシステイン血症合併腎不全モデルラットに対して代謝フラックス解析を施行した。その結果、ホモシステインを非可逆的に除くようにイオウ転移経路系の代謝回転が亢進している知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、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、その体内動態を検討した。両者が合併すると、ホモシステインを非可逆的に除去する方向にメチオニン-ホモシステイン代謝系が変化している知見が得られた。末期腎不全患者は心血管疾患を合併することが知られているが、バイオマーカーとしてホモシステインの血漿濃度を定期的に測定してリスク評価し、高ホモシステイン血症を合併しないような対策が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Renal failure is a frequent complication of cardiovascular disease. As decreased renal function increased plasma concentration of homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, hyperhomocysteinemia is thought to play in the development and progression of cardiovascular disease in patients with renal failure. To elucidate changes in the methionine-homocysteine metabolic system when hyperhomocysteinemia is associated with renal failure, we performed metabolic flux analysis in a 5/6-nephrectomized rats with hyperhomocysteinemia, which was bred on a homocystine-added diet. The findings indicate that the metabolic turnover of the transsulfuration pathway is enhanced so that homocysteine is irreversibly removed.

研究分野：病態生理学

キーワード：高ホモシステイン血症 腎不全 血管障害 メチオニン ホモシステイン 代謝フラックス 安定同位体 GC-MS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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 μM 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 μM)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。これまで、慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘除 (Nx) ラットを用いてこの課題に取り組んできたが、Nx ラットを長期間飼育してもヒトの高 Hcy 血症に相当する血漿濃度まで Hcy が高値にならないことが明らかになった。そこで、先行研究では Nx ラットを Met 強化食で飼育することで作出した腎不全と高 Hcy 血症の合併モデルラットを用い、血管作動薬に対する胸部大動脈の応答性を検討した。その結果、Nx ラットでは血管内皮障害を認めること、高 Hcy 血症単独では血管内皮障害を認めないのに、高 Hcy 血症を合併した Nx ラットでは血管平滑筋に及ぶ血管弛緩障害を呈することが明らかになり、高 Hcy 血症と腎不全の合併は心血管疾患・発症に関わっていることを示すことができた。また、Met-Hcy 代謝系全体の代謝フラックスが低下していることが示唆された。しかし、Met 強化食で飼育したため、当然ではあるが高 Met 血症も合併した。そのため、ここに得られた結果が、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。

2. 研究の目的

本研究では、高 Hcy 血症と腎不全が合併したときに Met-Hcy 代謝系に認める変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、Nx ラットをホモシステイン (Hcy-Hcy) 添加食で飼育することで作出した高 Hcy 血症合併腎不全モデルラットに対して、安定同位体標識体を用いた Met-Hcy 代謝フラックス解析を施行した。

(1) 高 Hcy 血症合併腎不全モデルラットの作出

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 0.5% Hcy-Hcy 添加食 (Hcy 群)あるいは基礎食 (Ctl 群)で飼育した (計 4 群:Nx+Hcy; Nx+Ctl; Sham+Hcy; Sham+Ctl)。

(2) 代謝フラックス解析

4 群のラットに、 $[^2\text{H}_7]\text{Met}$ あるいは $[^2\text{H}_8]\text{Hcy-Hcy}$ 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 $[^{13}\text{C}]\text{Met}$ 及び $[^{13}\text{C}_2]\text{Hcy-Hcy}$ 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ホルムによる誘導化を経て、生成した $[^2\text{H}_7]\text{Met}$ 、 $[^2\text{H}_4]\text{Met}$ 、 Met 、 $[^2\text{H}_4]\text{Hcy}$ 及び Hcy の N(O,S)-isobutyloxy carbonyl ethyl ester (IBC-Et)誘導体を GC-MS-SIM で測定し、 $[^2\text{H}_7]\text{Met}$ 、 $[^2\text{H}_4]\text{Met}$ 、 Met 、 $[^2\text{H}_4]\text{Hcy}$ 及び Hcy の血漿濃度を測定した。これらの値を用いて、投与した標識体が内因性非標識体によって希釈された割合、すなわち Enrichment を算出した。 $[^2\text{H}_7]\text{Met}$ 、 $[^2\text{H}_4]\text{Met}$ 及び $[^2\text{H}_4]\text{Hcy}$ の Enrichment (それぞれ E_{M7} 、 E_{M4} 、 E_{H4} とする) の時間推移をもとに、それらが定常状態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) 及びイオウ転移代謝回転速度 (TS) を算出した。

4. 研究成果

(1) 高 Hcy 血症合併腎不全モデルラットの作出

種々の実験腎炎モデルを作出し、自発的に高 Hcy 血症を呈するかを検討した。しかし、Hcy の血漿濃度は上昇するものの、ヒトの高 Hcy 血症 (15 μM 以上) に相当するモデルを作出することはできなかった。そこで、Nx ラットを Hcy-Hcy 添加食で長期間飼育し、高 Hcy 血症のみを合併した腎不全モデルを作出することにした。Nx ラットおよび Sham ラットを 0.5% Hcy-Hcy 添加食で 5 週間飼育したところ、Hcy の血漿濃度はいずれも高値になったが、Nx+Hcy 群 (58.5 \pm 30.0 nmol/mL) は Sham+Hcy 群 (13.2 \pm 4.6 nmol/mL) に比べて有意に高値であった。一方、Nx+Hcy 群の Met の血漿濃度 (50.2 \pm 8.6 nmol/mL) は Sham+Ctl 群 (46.8 \pm 2.2 nmol/mL) と差異が認められなかった。これらの結果から、高 Met 血症は伴わずヒトの高 Hcy 血症に相当する血漿濃度に Hcy が上昇した腎不全モデルを作出できたと判断した。

(2) [²H₈]Hcy-Hcy 投与

これまで Hcy の代謝フラックス解析には、L-[²H₄]Hcy を用いてきた。L-[²H₄]Hcy は保存中に徐々に酸化され、L-[²H₈]Hcy-Hcy が混入するようになる。そこで、L-[²H₄]Hcy thiolactone を合成し、用事開環することで L-[²H₄]Hcy としていた。しかし、本研究遂行のために行った光学純度の高い (ee 99% 以上) L-[²H₄]Hcy thiolactone の合成が不調に終わり、D-[²H₄]Hcy thiolactone が混入する (ee 90%) ようになった。D-[²H₄]Hcy thiolactone が開環して得られる D-[²H₄]Hcy は L-[²H₄]Hcy とは異なる体内動態を示す可能性があるため、その使用を断念した。

チオール基を有する Hcy は酸化的環境下である血漿中では、それ自身あるいは他のチオール基を有する化合物とジスルフィド結合を形成し、Hcy として存在するのはわずかである。そこで、L-[²H₄]Hcy の代わりに、L-[²H₈]Hcy-Hcy を用いることにし、その合成を試みた。L-[²H₄]Met を液体アンモニア中でリチウムと反応させることで脱メチル化を行った後、酸素ガスを通気することでジスルフィド結合を形成させ L-[²H₈]Hcy-Hcy を得た。生成物の光学純度をキラルカラムを用いた HPLC で測定した結果、ee 99% 以上であることが確認できた。(これ以降、L-の表記は省略する。)

[²H₈]Hcy-Hcy は [²H₄]Hcy の二量体であるので、先行研究で用いていた [²H₄]Hcy の投与速度の 1/2 の速度で [²H₈]Hcy-Hcy を急速静脈内投与 + 持続静脈内投与した。その結果、[²H₄]Hcy 投与では血漿 enrichment が 0.1 程度で定常状態に達したのに対して、[²H₈]Hcy-Hcy では定常状態の血漿 enrichment が 0.3 以上になった。安定同位体標識体を投与する代謝フラックス解析では、内因性物質の代謝プールを乱さないように定常状態における安定同位体標識体の血漿濃度が内因性物質の 10% 程度 (血漿 enrichment で 0.1 程度) になるようにするが、この結果はこれに反していた。この結果から、[²H₄]Hcy として投与した場合と [²H₈]Hcy-Hcy として投与した場合で、[²H₄]Hcy としての血漿中動態が異なることが考えられた。そこで、健常ラットに [²H₈]Hcy-Hcy を単回静脈内投与し、血漿中動態を検討した。その結果、[²H₈]Hcy-Hcy を投与した場合の全身クリアランス (CL_{tot}; 7.6 ± 0.8 mL/min/kg bw) は [²H₄]Hcy 投与時 (21.4 ± 4.1 mL/min/kg bw) の約 1/3 であり、投与型によって Hcy の血漿中動態が異なることが明らかになった。一方で、生成する [²H₄]Met の血漿濃度時間下面積 (AUC) は [²H₄]Hcy 投与と [²H₈]Hcy-Hcy 投与で差異はなかった。この結果から、[²H₄]Hcy と [²H₈]Hcy-Hcy では、血漿から組織への移行性に差異はあるものの、組織中での代謝には差異がないことが確認でき、どちらを用いても同等の評価が可能であると考えた。そこで、[²H₈]Hcy-Hcy を用いて代謝フラックス解析を施行することにし、ここで得られた CL_{tot} をもとに [²H₈]Hcy-Hcy の投与速度を設定した。

(3) 代謝フラックス解析

Nx+Hcy 群、Nx+Ctl 群、Sham+Hcy 群、および Sham+Ctl 群のラットに対して 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 Hcy-Hcy 添加食摂取 (Hcy 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 5/6 腎摘除、Hcy-Hcy 添加食摂取のいずれによっても有意に上昇した。また、5/6 腎摘除と Hcy-Hcy 添加食摂取の間には統計的に有意ではないが、わずかに交互作用性が認められた。そこで、4 群にわけ post-hoc test として Tukey 法を用いた one-way ANOVA で DM を比較したところ、Sham+Ctl 群 (73.1 ± 7.5 μmol/hr/kg) に比べて、Sham+Hcy 群 (102.1 ± 20.1 μmol/hr/kg)、Nx+Ctl 群 (96.4 ± 11.8 μmol/hr/kg)、Nx+Hcy 群 (109.3 ± 14.0 μmol/hr/kg) のいずれも有意に高かった。一方、RM は、5/6 腎摘除によって有意に低下 (p=0.0053) し、Hcy-Hcy 添加食摂取により低下する傾向を示した。また、その作用は相加的だった。定常状態では DM=RM+TS と考えられるので、これに従い TS を算出し、4 群で比較した。統計的な検討を行うことができなかったため明確なことは言いえないが、5/6 腎摘除、Hcy-Hcy 添加食摂取のいずれによってもイオウ転移代謝回転が亢進していることが示唆された。

Sham ラットと Nx ラットから摘出した肝臓および腎臓の Met-Hcy 代謝関連酵素の遺伝子発現量を real time-PCR を用いて比較した。Met の脱メチル化反応に関わる methionine adenosyltransferase 1、glycine N-methyltransferase 及び S-adenosylhomocysteine hydrolase の肝臓における発現は、Sham ラットに比べて Nx ラットで亢進していた。また、再メチル化反応に関わる methionine synthase および betaine homocysteine methyltransferase の肝臓における発現に Sham ラットと Nx ラットで差異は認められなかったのに対して、イオウ転移反応に関わる cystathionine γ -lyase の肝臓における発現は Nx ラットで亢進していた。

これらの結果から、Hcy-Hcy 添加食の摂取により過剰となった Hcy を再利用することなく、イオウ転移経路を経て非可逆的に除く方向に代謝回転が変化したものと考えられた。

腎不全に高 Hcy 血症が合併したときに 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、Hcy を非可逆的に除く方向に Met-Hcy の代謝回転が変化していることを示唆する知見が得られた。本研究では、当初予定になかった代謝フラックス解析に用いる標識体の [²H₄]Hcy から [²H₈]Hcy-Hcy への変更に伴い、[²H₈]Hcy-Hcy の合成と血漿中動態の基礎検討を行ったため、Hcy-Hcy 添加食で飼育し高 Hcy 血症のみ合併した腎不全モデルでは血管系にどのような影響があったのかを検討することができなかった。今後、これについて検討を重ね、高 Hcy 血症と腎不全の合併が血管系に与える影響を評価していきたい。また、イオウ転移経路の代謝回転を評価する系を確立し、本研究成果の妥当性を評価していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroshi Hasegawa, Akira Kotani, Hideki Hakamata, Kimiyoshi Ichida, Yozuru Hayashi	4. 巻 1657
2. 論文標題 A simple method for daily inspections of gas chromatography-mass spectrometry systems with an instrumental detection limit as an indicator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Chromatogr A	6. 最初と最後の頁 462570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chroma.2021.462570	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 -
1. 著者名 Amir Meftah, Hiroshi Hasegawa, Joshua T. Kantrowitz	4. 巻 12
2. 論文標題 D-Serine: A Cross Species Review of Safety	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychiatry	6. 最初と最後の頁 726365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsy.2021.726365	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 -
1. 著者名 Yu Abe, Yu Aihara, Wakaba Endo, Hiroshi Hasegawa, Kimiyoshi Ichida, Mitsugu Uematsu, Shigeo Kure	4. 巻 26
2. 論文標題 The effect of dietary protein restriction in a case of molybdenum cofactor deficiency with MOCS1 mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	6. 最初と最後の頁 100716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygm.2021.100716	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 -
1. 著者名 Shirakawa Shunichi, Murakami Tatsufumi, Hashiguchi Akihiro, Takashima Hiroshi, Hasegawa Hiroshi, Ichida Kimiyoshi, Sunada Yoshihide	4. 巻 61
2. 論文標題 A Novel PRPS1 Mutation in a Japanese Patient with CMTX5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8029-21	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 弘, 増田 奈美, 市田 公美
2. 発表標題 ラットにおけるD-セリンのトキシコキネティクス
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第11回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川 弘, 田村 優香, 山口 凜々花, 土橋 詩織, 篠原 佳彦, 市田 公美
2. 発表標題 ラットにおけるホモシステインの体内動態
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第16回学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------