

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300243

研究課題名(和文)尿中カルボニル物質による生活習慣病マーカーの開発

研究課題名(英文)Identification of the urinary biomarker to predict hypertension in young adults

研究代表者

飛田 渉(Hida, Wataru)

東北大学・高等教育開発推進センター・名誉教授

研究者番号：10142944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は尿中の生活習慣病マーカーの同定を目的とし、若年者および一般住民を対象として研究を行った。2011年の本学新入生と宮城県柴田郡川崎町の住民を対象とし、尿中もしくは血清中に含まれるアンジオテンシノーゼン(AGT)、単球走化因子(MCP-1)、TBARS、カルボニル化合物を測定した。測定した物質と高血圧の関連について調べた結果、若年者肥満者で尿中AGT、MCP-1排泄量が多いほど、血圧が高いことが分かった。一般住民では、肥満に関わらず尿中AGT排泄量が多いと血圧が高いことが分かった。本研究から尿中AGT排泄量が血圧を予測するマーカーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to identify the urinary biomarker to predict the pathogenesis of hypertension. We enrolled incoming freshmen of our university and adults who have taken health checkup in Kawasaki town in Miyagi in 2011. Urinary excretion of angiotensinogen (AGT), inflammation markers, oxidative stress markers and carbonyl compounds and serum AGT, inflammation markers levels were analyzed. The present study determined the association between blood pressure and urinary AGT and inflammation markers excretion in young obese adults. From multiple linear regression analysis, urinary AGT excretion was significantly associated with blood pressure in adults.

This study suggested that urinary AGT excretion would predict the pathogenesis of hypertension in young obese adults.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：尿中バイオマーカー 高血圧 生活習慣病 アンジオテンシノーゼン 腎内レニン・アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

腎臓は1分間に100 mLもの血液を濾し取っているため、尿には血液と同程度の生体情報を含んでいる。血液は医療従事者が必要かつ針を使う侵襲性があるのに対し、尿は本人が容易に取得できかつ針を使わない非侵襲性である点で優れている。しかも容器を事前に渡すことで食事などの影響を回避し、極力均一な条件で検体採取することができる。これらのことから、尿は強力なバイオマーカーを含む優れた検体であると、我々は着目した。

近年、若年者の肥満が増加しており、生活習慣の教育が重要である。特に大学生は生活習慣が乱れやすく、将来の生活習慣病に大きく影響する。生活習慣病の診断は通常血液検査を行うが、本学における学生健診において血液検査を行うことは侵襲性と予算の面から困難であり、大学生への生活習慣教育および生活習慣病マーカーが乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

一人暮らしになることの多い大学生は生活習慣が乱れやすく、生活習慣病予備群が多く含まれる。生活習慣病予備群をスクリーニングすることで生活習慣病の予防および早期診断を行うことが可能である。本研究では、尿から生活習慣病マーカーとなる物質の同定を目的としている。

3. 研究の方法

(1)若年者を対象とした研究

本学 2011 年度新入生定期健康診断時に用いられる尿検体のうち、同意が得られた尿検体(2428名:男子1775名 19±1.0歳、女子653名 19±1.8歳)を回収した。一次健診では回収した早朝尿を用いて従来の健診項目である尿蛋白、尿潜血、尿糖、尿ウロビリノーゲンを試験紙で測定している。本研究では、肥満と非肥満に偏りが出ないように無作為に男子学生111名を抽出し、研究対象とした。尿中アンジオテンシノーゼン(AGT)排泄量、チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)排泄量、単球走化因子(MCP-1)排泄量、クレアチニン排泄量、Na排泄量、カルボニル化合物(メチルグリオキサール:MG、3-デオキシグルコソン:3-DG)排泄量の測定を行った。

それぞれの測定は以下の手法を用いて測定を行った。

尿中 AGT および MCP-1 排泄量:ELISA 法

尿中 TBARS 排泄量:チオバルビツール酸法

尿中クレアチニンおよび Na 排泄量:自動分析装置

尿中カルボニル物質排泄量:HPLC

24 時間尿中クレアチニン排泄量(Pre.Cr)は下記の式を用いて換算した

$$-2.04 \times (\text{age} + 14.89) \times \text{体重}(\text{kg}) + 16.14 \times \text{身長}(\text{cm}) - 2244.45$$

24 時間尿中 Na 排泄量は下記の指揮を用いて換算した

$$21.98 \times [(\text{尿中 Na 濃度}(\text{mEq/L}) / \text{尿中クレアチニ}$$

ン濃度(mg/L)×Pre.Cr]^{0.392}

(2)一般市民を対象とした研究

本研究では、宮城県柴田郡川崎町民を対象とした2011年度住民総合健診を受診した1717名のうち、同意が得られ尿検体および血清検体を回収し、対象とする指標を測定することができた386名(男性175名、女性211名)のうち、尿中AGT排泄量、TBARS排泄量、MCP-1排泄量、クレアチニン排泄量、Na排泄量、カルボニル化合物(MG、GO、3-DG)排泄量、血清はAGT、MCP-1濃度の測定を行うことができた355名(男性:162名、女性:193名)を対象とした。

それぞれの測定は以下の手法を用いて測定を行った。

尿中 AGT および MCP-1 排泄量:ELISA 法

尿中 TBARS 排泄量:チオバルビツール酸法

尿中クレアチニンおよび Na 排泄量:自動分析装置

尿中カルボニル物質排泄量:LC-MS/MS

(1)、(2)で得られたデータはJMP Pro 10.0.2およびSASで統計解析をおこなった。有意水準は0.05%未満とした。

4. 研究成果

(1)若年者を対象とした研究

肥満と高血圧には強い関連があり、小児高血圧や高血圧前症が若年者で広がっている。そこで本研究では対象学生を肥満群(BMI≥25 kg/m²)と標準群に分け、血圧と尿中マーカーとの関連を調べた。下表に対象者背景を示した。

	Total 111	BMI, kg/m ²		P
		<25 59	≥25 52	
年齢, 歳	19.1±0.8	19.2±0.8	19.1±0.9	0.7
身長, cm	171.9±5.2	171.9±5.2	168.9±8.8	0.04
体重, kg	57.4±8.6	57.4±8.6	85.3±12.8	<.0001
BMI, kg/m ²	19.5±3.0	19.5±3.0	29.9±4.0	<.0001
推定24-h塩分排泄量, mmol/Pre.day	52.7±12.0	51.7±11.6	53.9±12.5	0.3
収縮期血圧, mmHg	127.9±17.1	119.1±12.1	137.8±16.5	<.0001
拡張期血圧, mmHg	75.1±10.6	70.2±8.2	80.6±10.4	<.0001
AGT, mg/Pre.day*	7.4 (4.8-11.6)	7.5 (4.7-10.7)	7.3 (5.0-12.1)	0.5
MCP-1, ng/Pre.day*	78.5 (53.5-118.7)	68.2 (46.8-105.4)	90.4 (58.8-141.9)	0.06
MG, μmol/Pre.day*	1.0 (0.7-1.4)	1.0 (0.7-1.4)	1.0 (0.7-1.4)	0.4
3-DG, μmol/Pre.day*	4.6 (3.5-6.8)	4.8 (3.3-7.0)	4.6 (3.7-6.2)	0.5

*中央値(25-75パーセンタイル)を示す

本研究でもこれまでの報告と同様に、標準群と肥満群の間に収縮期血圧と拡張期血圧に有意な差が認められた。

我々は尿中マーカーとして、腎内レニン・アンジオテンシン系(RAS)のマーカーとなる尿中AGT排泄量、および炎症マーカーである尿中MCP-1排泄量、カルボニルストレスのマーカーとなる尿中MG排泄量、尿中3-DG排泄量と血圧との関連を調べた。その結果、肥満群において収縮期血圧が高い人では、尿中AGT排泄量および尿中MCP-1排泄量が多い傾向が認められた。尿中AGT、MCP-1、MG、3-DG排泄量は、正規分布を示していなかったため、自然対数変換を行い以下の解析を行った。目的変数を収縮期血圧と拡張期血

圧として多変量解析を行った。その結果、肥満群では自然対数変換した尿中 AGT 排泄量および尿中 MCP-1 排泄量は、1 SD(標準偏差)上昇毎に収縮期血圧が 3.9 mmHg および 3.7 mmHg、拡張期血圧が 2.7 mmHg および 1.9 mmHg それぞれ上昇することが分かった。しかし、尿中 MG 排泄量と尿中 3-DG 排泄量では有意な上昇は認められなかった。

	目的変数: 収縮期血圧, mmHg					
	BMI<25 kg/m ² (n=59)			BMI≥25 kg/m ² (n=52)		
	β	(SE)	P	β	(SE)	P
ln AGT (1 SD上昇毎)	0.2	-1.6	0.8	3.9	-1.8	0.04
ln MCP1 (1 SD上昇毎)	-0.7	-2	0.7	3.7	-1.6	0.03
ln MG (1 SD上昇毎)	-2	1.8	0.3	2.9	2.4	0.2
ln 3-DG (1 SD上昇毎)	-1.8	1.7	0.3	2.1	2.4	0.4

これらの結果から、尿中 AGT 排泄量および尿中 MCP-1 排泄量が、若年者において生活習慣病、特に高血圧のマーカーになるかについて検討を行うため、受信者動作特性(ROC)解析を行い、感度、特異度、AUC (Area under the curve)から検討を行った。図1に肥満群における尿中 AGT 排泄量、尿中 MCP-1 排泄量および両マーカーを合わせたマーカーを対象とした ROC 曲線を示した。ROC 解析では AUC の値が高い程、マーカーとしての有用性が高いことを示している。

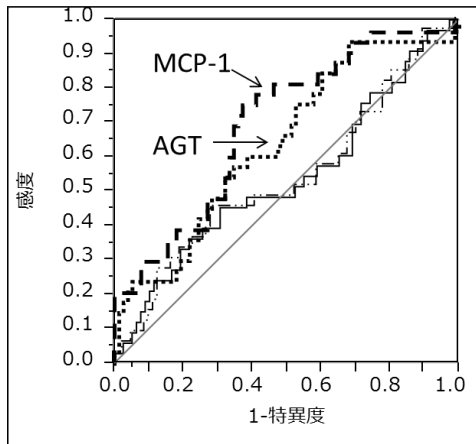


図1 肥満群における ROC 曲線の比較

Table 推定カットオフ値と AUC の比較

	AUC	p	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cutoff value
MCP-1 (ng/Pre day)	0.703	0.0002	75.8	62.8	180.6
AGT (mg/Pre day)	0.646	0.0105	93.9	32.1	5.1
MG (μmol/Pre day)	0.537	0.995			
3-DG (μmol/Pre day)	0.533	0.8136			

補正項目: 年齢、推定24時間尿中塩分排泄量

ROC 解析から尿中 AGT 排泄量および尿中 MCP-1 排泄量がマーカーとして高血圧を予測していることが示された。

近年、尿中 AGT は腎内 RAS の活動マーカーとして注目されている。腎内 RAS の活性化は、慢性腎臓病に強く関連している。また尿中 MCP-1 排泄量は炎症マーカーである。本研

究から、肥満の若年者において血圧の上昇と共に腎内 RAS、炎症が亢進していることが示唆され、尿中 AGT 排泄量および尿中 MCP-1 排泄量が高血圧のマーカーになることが示唆された。一方、尿中カルボニル物質排泄量は、横断研究では高血圧を予測しない結果であった。

(2)一般市民を対象とした研究

若年者を対象とした結果から、尿中 AGT 排泄量と MCP-1 排泄量が、特に肥満者において血圧と強く関連することがわかった。つまり若年肥満者では腎内 RAS および炎症が亢進しており、尿中 AGT 排泄量および尿中 MCP-1 排泄量が高血圧のマーカーとなり得ることが分かった。さらに本研究では、一般住民を対象とし尿中 AGT、MCP-1、TBARS、MG、GO、3-DG 排泄量、血清中 AGT、MCP-1 と血圧の関連の評価を行った。各種定義は以下の通りである。

糖尿病: HbA1c≥6.5、糖尿病薬服用

脂質異常症: TG≥150、HDL<40、LDL≥140、脂質異常症薬服用

高血圧者: 収縮期血圧/拡張期血圧≥140/90 または降圧薬服用

対象者は正常血圧群(<140/90 mmHg)、と高血圧群(≥140/90 mmHg)の2群に分けた。

下表に対象者背景を示した。

	Total	正常域血圧 (n=193)	高血圧者 (n=162)	P
年齢, 歳	66.6±14.4	62.3±15.9	71.6±10.3	<.0001
男性, %	45.6	46.6	44.4	0.7
BMI, kg/m ²	23.5±3.2	22.9±3.2	24.2±3.1	0.0002
喫煙, %	15.8	19.7	11.1	0.03
脳心血管疾患既往, %	9.6	7.3	12.3	0.1
脂質異常症, %	53.2	47.7	59.9	0.02
糖尿病, %	10.4	8.3	13.0	0.2
HbA1c, %	5.6±0.6	5.4±0.6	5.7±0.7	0.0004
推定24h尿中Na*,	164.7±37.1	161.1±35.4	169.0±38.7	0.045
降圧薬服用, %	34.6	0.0	75.9	<.0001
収縮期血圧, mmHg	127.0±17.8	118.7±11.4	136.9±18.9	<.0001
拡張期血圧, mmHg	73.5±11.7	69.4±8.9	78.4±12.7	<.0001

*データは348名のみ

正常血圧群と高血圧群における、尿中 AGT、MCP-1、TABRS、MG、GO、3-DG 排泄量の濃度を下表に示した。

	Total	正常域血圧 (n=193)	高血圧者 (n=162)	P
尿中指標				
AGT, ng/cre mg	13.8 (6.7-28.5)	10.6 (5.7-20.4)	17.8 (9.4-37.4)	<.0001
MCP1, pg/cre mg	258.4 (151.9-505.3)	238.0 (145.5-460.2)	273.2 (167.2-581.8)	0.1
TBARS, nM/cre mg	6.0 (1.3-8.5)	5.8 (4.3-8.0)	6.4 (4.4-9.1)	0.2
MG, ng/cre mg	2.3 (1.6-3.6)	2.0 (1.5-3.0)	2.6 (1.9-4.1)	<.0001
GO, μmol/cre mg	3.7 (2.0-5.9)	3.3 (1.8-5.0)	4.5 (2.5-6.8)	0.0003
3-DG, μmol/cre mg	1.6 (1.0-2.3)	1.5 (1.0-2.1)	1.8 (1.2-2.5)	0.0007

*中央値 (25-75パーセンタイル) を示す。検定にはWilcoxon検定を用いた。

血清中 AGT、MCP-1 濃度を下表に示した。

	Total	正常域血圧 (n=193)	高血圧者 (n=162)	P
血清中指標				
AGT, ng/mL	45.9 (30.0-56.3)	44.7 (35.5-56.6)	47.0 (37.7-56.2)	0.2
MCP1, pg/mL	322.3 (208.6-545.5)	304.3 (201.0-545.5)	327.5 (213.4-544.5)	0.4

正常域血圧群と高血圧群を比較した結果、尿中 AGT、MG、GO、3-DG 排泄量が高血圧群において有意に高値であった。一方、血清中 AGT、MCP-1 量に差は認められなかった。この結果から、目的変数を収縮期血圧と拡張期血圧として多変量解析を行ったところ、自然対数変換した尿中 AGT 排泄量 (ln AGT)、尿中 MG 排泄量 (ln MG)、尿中 GO 排泄量 (ln GO) が 1 SD (標準偏差) 上昇毎に収縮期血圧および拡張期血圧が有意に上昇することが分かった。血清中の AGT 量においても 1 SD (標準偏差) 上昇毎に収縮期血圧および拡張期血圧が有意に上昇していた。つまり、これらの排泄量が多い人程、血圧が高いという結果であった。

説明変数 (1 SD 上昇毎)	目的変数：収縮期血圧		
	β	SE	P
尿中指標			
ln AGT	2.75	0.62	<.0001
ln MCP1	-0.17	0.63	0.8
ln TBARS	0.38	0.61	0.5
ln MG	1.79	0.68	0.009
ln GO	2.21	0.65	0.0008
ln 3-DG	1.46	0.67	0.03
血清中指標			
ln AGT	4.08	1.59	0.01
ln MCP1	0.51	0.91	0.6

補正項目：年齢、性別、BMI、喫煙、CVD 既往、糖尿病、降圧薬服用、脂質異常症

説明変数 (1 SD 上昇毎)	目的変数：収縮期血圧		
	β	SE	P
尿中指標			
ln AGT	2.75	0.62	<.0001
ln MCP1	-0.17	0.63	0.8
ln TBARS	0.38	0.61	0.5
ln MG	1.79	0.68	0.009
ln GO	2.21	0.65	0.0008
ln 3-DG	1.46	0.67	0.03
血清中指標			
ln AGT	4.08	1.59	0.01
ln MCP1	0.51	0.91	0.6

補正項目：年齢、性別、BMI、喫煙、CVD 既往、糖尿病、降圧薬服用、脂質異常症

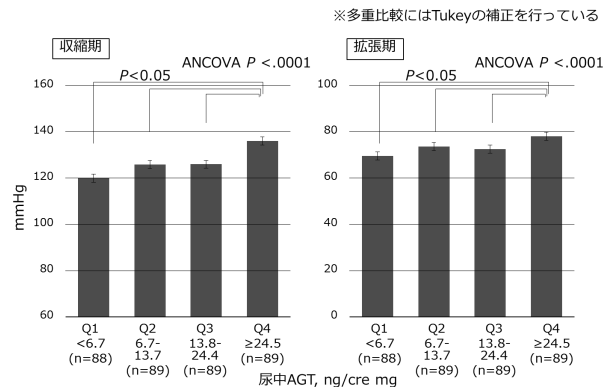
これらの因子のうち、血圧と特に関連が強いものを選択するため、ステップワイズ重回帰分析を行った。年齢、性別、BMI、喫煙、脳心血管疾患既往、糖尿病、降圧薬服用、脂質異常症を補正し、全指標をモデルに投入し、選択基準を $p < 0.05$ 、除外基準を $p < 0.05$ として行った。

ステップワイズの結果を下表にまとめた。

	目的変数：収縮期血圧		目的変数：拡張期血圧		
	Partial R ²	P	Partial R ²	P	
尿中 AGT	0.116	<.0001	尿中 AGT	0.041	0.0001
BMI	0.027	0.0009	BMI	0.029	0.0009
尿中 MG	0.018	0.007	糖尿病	0.032	0.0005
降圧薬服用	0.013	0.03	CVD 既往	0.014	0.02
CVD 既往	0.011	0.03	降圧薬服用	0.014	0.02

ステップワイズ重回帰分析の結果から、尿中 AGT 排泄量をもっとも強く血圧と関連していることが分かった。

下図に尿中 AGT 排泄量を四分位で群に分けた結果、尿中 AGT 排泄量の上昇と共に収縮期および拡張期血圧が有意に上昇していた。



平均値およびP値は、年齢、性別、BMI、喫煙、CVD 既往、糖尿病、降圧薬服用、および脂質異常症によって補正されている。エラーバーは標準誤差を示す。

さらに尿中 AGT 排泄量が生活習慣病(高血圧)のマーカになるかについて検討を行った(図 2)。ROC 解析は、年齢、性別、BMI、喫煙、CVD 既往歴、糖尿病、脂質以上、降圧薬服用で補正した。

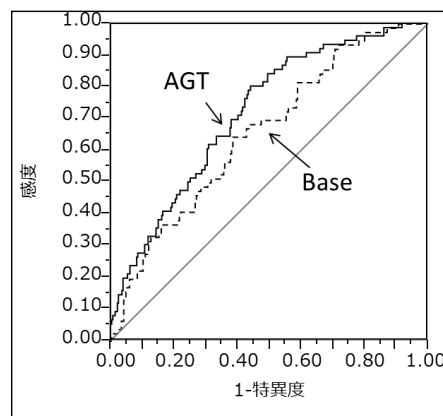


図 2 ROC 曲線の比較

Table 2 AUC の比較

	AUC	p
Base	0.6583	reference
U AGT (ng/Cre)	0.7173	0.028
U GO (μmol/Cre)	0.692	0.0738
U MG (μmol/Cre)	0.6722	0.3532

その結果、尿中マーカーの中でも AGT 排泄量が高血圧を予測するマーカーとして有用であることが示唆された。この時の尿中 AGT 排泄量のカットオフ値は 9.3 mg/Cre mg で、感度は 80.3%、特異度は 56%であった。

考察

本研究では、当初尿中カルボニル物質排泄量が生活習慣病を予測するマーカーと仮説を立てて研究を進めていたが、研究を進める中で、腎内の RAS 活動を反映している尿中 AGT 排泄量が血圧と関連していることを見つけた。若年者では、特に肥満者において尿中 AGT 排泄量と尿中 MCP-1 排泄量が血圧と関連していたが、一般住民では尿中カルボニル排泄量も血圧と関連していたが、高血圧を予測するマーカーとしては尿中 AGT 排泄量が有用であることが示唆された。

健康診断時に得られる尿で、尿中 AGT 排泄量を測定することで、若年者における生活習慣病発症を予防することが可能と考えられるため、今後対象集団を大きくし検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Sato Emiko, Mori Takefumi, Nakamichi Yoshimi, Fujiwara Mutsuko, Oba Ikuko, Tanno Mizuo, Ogawa Susumu, Kinouchi Yoshitaka, Sato Hiroshi, Hida Wataru, Ito Sadayoshi, "Role of renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation to the blood pressure control in young subjects", XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease ICRNM, 査読無, 2012, 53-59

(2) 佐藤 恵美子、森 建文、伊藤 貞嘉、"慢性腎臓病と炎症と RAS"、Angiotensin Reserch, 査読無, 2012, 9 13-17

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 王安 邑、Urinary angiotensinogen and carbonyl compounds excretion associate with blood pressure in community health checkup-Kawasaki study-, WORLD CONGRESS OF NEPHROLOGY 2013、2013 年 5 月 31 日、香港 中国

(2) 佐藤 恵美子、地域健康診断における尿中アンジオテンシノーゼンと血圧の関連~Kawasaki Study~, 第 86 回日本内分泌学会、2013 年 4 月 25 日、仙台

(3) 佐藤 恵美子、Urinary angiotensinogen associate with urinary albumin excretion and blood pressure in community health check-up-Kawasaki study-, 24th Scientific meeting of the

international society of hypertension、2012 年 10 月 2 日、シドニー オーストラリア

(4) 佐藤 恵美子、若年層の生活習慣病予備群では腎内レニン・アンジオテンシン系、酸化ストレスおよび炎症が亢進しているのか?、第 16 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2012 年 11 月 23 日、東京

(5) 佐藤 恵美子、Role of renin-angiotensin system and oxidative stress and inflammation to the blood pressure control in young subjects, 16th International congress in renal nutrition and metabolism (ICRMM) in Honolulu, 2012 年 6 月 28 日、ホノルル ハワイ

(6) 森 建文、若年者におけるレニン・アンジオテンシン系と酸化ストレスおよび炎症マーカーの関連、第 12 回日本抗加齢医学会総会、2012 年 6 月 23 日、横浜

(7) 佐藤 恵美子、若年肥満者の高血圧と尿中バイオマーカーの関連、第 1 回臨床高血圧フォーラム、2012 年 5 月 12 日、大阪

(8) 佐藤 恵美子、若年肥満者における尿中カルボニル物質と血圧との関係、第 21 回日本メイラード学会年会、2011 年 10 月 28 日、東京

(9) 佐藤 恵美子、Urinary carbonyl compounds and oxidative stress may predict hypertension in obese young adult women, HIGH BLOOD PRESSURE RESEARCH 2011, 2011 年 9 月 22 日、オーランド アメリカ

(10) 森 建文、若年高血圧における尿中酸化/カルボニルストレスおよび炎症マーカーの確立、第 11 回日本抗加齢医学会総会、2011 年 5 月 27 日、京都

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
飛田 渉 (Hida Wataru)
東北大学・高等教育開発推進センター・名誉教授

研究者番号：10142944

(2) 研究分担者

森 建文 (Mori Takefumi)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40375001