

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590202

研究課題名(和文)腎機能低下に伴う高ホモシステイン血症の成因機構と心血管疾患発症・進展への影響

研究課題名(英文)Effect of reduced renal function on homocysteine metabolism

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：腎機能が低下すると、心血管疾患の危険因子とされている高ホモシステイン血症を合併する。この成因機構を明らかにすることを目的に、安定同位体標識体を用いた代謝フラックス法を開発し、腎部分摘除ラットを用い検討した。その結果、腎実質の減少に伴う再メチル化クリアランスの低下を補うようにホモシステインの血漿中濃度を上昇させることが、高ホモシステイン血症成因に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cardiovascular diseases and occurs frequently in end-stage renal disease, but the pathogenesis is poorly understood. The plasma homocysteine concentration represents the balance between its entry and removal from the circulation. This study is conducted to clarify whether hyperhomocysteinemia in renal disease is due to increased entry or decreased removal. The result of the present study showed that the conversion of homocysteine to methionine was substantially decreased in the 3/4-nephrectomized rats. Decreased remethylation may explain hyperhomocysteinemia in renal disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ホモシステイン メチオニン メチル基転移 安定同位体 腎不全 GC-MS 代謝フラックス

### 1. 研究開始当初の背景

メチオニンの代謝物であるホモシステインの血漿中濃度が基準値よりも高く維持された状態(高ホモシステイン血症)は、心血管疾患のリスクファクターと考えられている。ホモシステインは腎不全患者において蓄積されやすく、透析患者の主要な死因の一つである心血管疾患との関連性が注目されている。しかし、腎機能低下に伴って何故ホモシステインの血漿中濃度が上昇するのか、その上昇によって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全く不明である。

ホモシステインは、再びメチル化されメチオニンに戻る経路(再メチル化経路)とシスタチオニンを經由して非可逆的に除かれつつシステインを生成する経路(イオウ転移経路)の二経路によって代謝される。ホモシステインの生成と代謝は、S-アデノシルメチオニンや葉酸を基質とする生体内一炭素転移反応と密接に関連し、相互調節されている。研究代表者は、この調節機構の異常が高ホモシステイン血症の成因であり、一炭素転移反応異常を介して心血管疾患発症・進展に関与していると考えた。

### 2. 研究の目的

ホモシステインの生成と代謝のいずれに異常があるかを評価することのできる代謝フラックス解析法を構築すること、腎機能低下に伴う高ホモシステイン血症の成因機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究のストラテジーは以下の通りである。メチオニンの3、4位及びS-メチル基に重水素を導入した[3,3,4,4,S-メチル- $^2\text{H}_7$ ]メチオニン( $^2\text{H}_7$ メチオニン)をトレーサーとして投与すると、生体内で脱メチル化されて[3,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]ホモシステイン( $^2\text{H}_4$ ホモシステイン)が、さらにこれが再メチル化されると[3,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]メチオニン( $^2\text{H}_4$ メチオニン)が生成する。 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニンと内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステインと内因性ホモシステインは、質量数が異なるため、それぞれガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)で区別して測定することができる。 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインの血漿中動態から脱メチル化経路、再メチル化経路及びイオウ転移経路に関する動態パラメータを得ることができる。本研究は、ストラテジー遂行に必要な安定同位体標識体の合成、分析法の開発、解析法の構築及び実験動物を用いた動態試験から構成される。

(1) 安定同位体標識メチオニン及びホモシステインの合成

DL- $^2\text{H}_4$ メチオニンを原料に、光学活性な $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$

ホモシステインチオラク톤を、DL-[1- $^{13}\text{C}$ ]メチオニン( $^{13}\text{C}$ メチオニン)を原料に分析上の内標準物質として用いるDL-[1,1'- $^{13}\text{C}_2$ ]ホモシステイン( $^{13}\text{C}_2$ ホモシステイン)をそれぞれ合成した。

(2) GC-MSを検出手段とする安定同位体希釈分析法による血漿中 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及びホモシステインの同時定量法の開発

$^{13}\text{C}$ メチオニン及び $^{13}\text{C}_2$ ホモシステインを内標準として用い、血漿中の $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及び内因性ホモシステインをGC-MS-選択イオン検出(SIM)法で同時定量する方法を検討した。

(3) 単回静脈内投与法によるメチオニン-ホモシステイン代謝のフラックス解析

$^2\text{H}_7$ メチオニンを単回静脈内投与したときの $^2\text{H}_7$ メチオニン及びその代謝物のenrichmentの時間変化を用いて、メチオニンからホモシステインへの脱メチル化代謝速度(DM)、ホモシステインのメチオニンへの再メチル化代謝速度(RM)及びホモシステインからシスタチオニンへのイオウ転移速度(TS)を算出する方法を考案した。

健常ラットに、 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインをそれぞれ個別に単回静脈内投与後、経時採血した。 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及び内因性ホモシステインの血漿中濃度をGC-MSで分別測定した。標識体と非標識体の総和に占める $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステインの割合(enrichment;  $E_{M7}$ 、 $E_{M4}$ 、 $E_{H4}$ )を算出し、それらの時間推移曲線を時間  $t=0$  から  $t$  まで積分した値( $AUC_{M7}$ 、 $AUC_{M4}$  及び  $AUC_{H4}$ )を用いて、DM、RM 及び TS を算出した。

(4) 持続静脈内投与法によるメチオニン-ホモシステイン代謝のフラックス解析

メチオニン-ホモシステイン代謝サイクルが定常状態にあるときのDM、RM 及び TS を求める方法を考案した。

健常ラット及び腎部分摘除ラットに、 $^2\text{H}_7$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインをそれぞれ個別に急速静脈内投与 + 持続静脈内投与した。このとき、投与する $^2\text{H}_7$ メチオニンや $^2\text{H}_4$ ホモシステインによって内因性メチオニン及びホモシステインの代謝プールが変動することを極力抑えるため、(3)で得られた知見を用い、投与した $^2\text{H}_7$ メチオニンや $^2\text{H}_4$ ホモシステインの血漿中濃度が内因性メチオニン及びホモシステインの約 1/10 になるように投与量及び投与速度を設定した。経時採血して得た血漿中の $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及び内因性ホモシステインの血漿中濃度をGC-MSで分別測定後、 $E_{M7}$ 、 $E_{M4}$

及び  $E_{H_4}$  を算出した。採血時間に対して  $E_{M_7}$ 、 $E_{M_4}$  及び  $E_{H_4}$  をそれぞれプロットしたグラフから、 $E_{M_7}$ 、 $E_{M_4}$  及び  $E_{H_4}$  が一定になった値を求め、DM、RM 及び TS を算出した。さらに、DM を投与前の内因性メチオニンの血漿中濃度で除することで脱メチル化クリアランス ( $CL_{DM}$ ) を、RM 及び TS を投与前の内因性ホモシステインの血漿中濃度で除することで、それぞれ再メチル化クリアランス ( $CL_{RM}$ ) 及びイオウ転移クリアランス ( $CL_{TS}$ ) を算出した。健常ラットと腎部分摘除ラットにおけるそれらの値を比較し、メチオニン-ホモシステイン代謝系に対する腎の寄与を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 安定同位体標識メチオニン及びホモシステインの合成

DL- $[^2H_4]$ メチオニンを液体アンモニア中リチウムと反応させ DL- $[^2H_4]$ ホモシステインとした後、重水素標識ヨードメタンによりメチル化し、DL- $[^2H_7]$ メチオニンを得た。これを無水酢酸で N-アセチル化後、アシラーゼで立体選択的に加水分解し、L- $[^2H_7]$ メチオニンを得た。L- $[^2H_4]$ メチオニンは、DL- $[^2H_4]$ メチオニンを N-アセチル化後アシラーゼを用いた光学分割により得た。

DL- $[^2H_4]$ メチオニンをヨウ化水素酸中で加熱還流することで閉環し、DL- $[^2H_4]$ ホモシステインチオラクトンを得た。これを光学活性な 2-メトキシフェニル酢酸と縮合しジアステレオマーアミドとした。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりジアステレオマー分離をしたのち、塩酸-エタノール中で加水分解し、光学活性な L- $[^2H_4]$ ホモシステインチオラクトンを得た。L- $[^2H_4]$ ホモシステインチオラクトンは、動物への投与前に水酸化ナトリウム溶液中で開環させ L- $[^2H_4]$ ホモシステインとする。

これらはいずれも、投与実験に用いるのに十分な同位体純度及び光学純度を有していた。

DL- $[1-^{13}C]$ メチオニン ( $[^{13}C]$ メチオニン) を液体アンモニア中リチウムと反応させて得た DL- $[1-^{13}C]$ ホモシステインを酸化し、DL- $[1,1'-^{13}C]$ ホモシステイン ( $[^{13}C_2]$ ホモシステイン) を得た。これは GC-MS における内標準物質として用いるのに十分な同位体純度を有していた。

##### (2) GC-MS を検出手段とする安定同位体希釈分析法による血漿中 $[^2H_7]$ メチオニン、 $[^2H_4]$ メチオニン、メチオニン、 $[^2H_4]$ ホモシステイン及びホモシステインの同時定量法の開発

メチオニンやホモシステインのようなアミノ酸は難揮発性物質なため、GC-MS で測定するには揮発性化合物に誘導化する必要がある。種々の誘導化法を検討した結果、メチオニン及びホモシステインを水-エタノール-ピリジン混液中でクロロギ酸イソブチルと反応させて生成する *N*(*O,S*)-イソブチルオキ

シカルボニル エチルエステル (IBC-0Et) 誘導体が、GC で良好なピーク挙動を示すこと、化学イオン化法を用いた MS 分析においてそれらの分子量関連イオンが基準ピークとして検出されることなど、GC-MS 分析に適していることを見いだした。

ラット血漿に、既知量の  $[^2H_7]$ メチオニン、 $[^2H_4]$ メチオニン及び  $[^2H_8]$ ホモシステインを添加した試料を用いて、本法の分析精度を検討した。その結果、期待値と測定値の相対誤差は、 $[^2H_7]$ メチオニンで -2.4~5.7%、 $[^2H_4]$ メチオニンで -1.2~0.2%、 $[^2H_4]$ ホモシステインで -5.3~-1.9% であり、また変動係数もそれぞれ 7% 以内、5% 以内、8% 以内であった。日間誤差もほぼ同様であり、本法が、メチオニン及びホモシステインの代謝フラックスを解析するのに十分な精度、再現性を有していることが明らかになった。

##### (3) 単回静脈内投与法によるメチオニン-ホモシステイン代謝のフラックス解析

単回静脈内投与法において、代謝回転速度は、投与量を血漿 enrichment 時間下面積 ( $AUC_E$ ) で除することで算出できる。そこで、 $[^2H_7]$ メチオニン投与後の  $E_{M_7}$ 、 $E_{M_4}$  及び  $E_{H_4}$  の時間推移曲線から、 $[^2H_7]$ メチオニン、 $[^2H_4]$ メチオニン及び  $[^2H_4]$ ホモシステインの enrichment の  $AUC_E$  を求めた。重水素標識した S-メチル基が脱メチル化によって脱離する  $[^2H_7]$ メチオニンは時間の経過に従って一次消失したが、その代謝物である  $[^2H_4]$ ホモシステイン及び  $[^2H_4]$ メチオニンは標識が脱落することなく内因性ホモシステイン及びメチオニンの代謝プールでゆっくりと希釈されるため、消失相における濃度変化がほとんど観察されなかった。そのため、測定時間までの  $AUC_{E(0-t)}$  に比べて、時間を まで外挿した  $AUC_{E(0-\infty)}$  が著しく大きい値になった。 $[^2H_4]$ メチオニン及び  $[^2H_4]$ ホモシステイン投与後の  $[^2H_4]$ メチオニンや  $[^2H_4]$ ホモシステインの  $AUC_{E(0-\infty)}$  も同様に  $AUC_{E(0-t)}$  に比べて高値であった。これらの値を用いた解析では信頼性の高い代謝回転速度を得ることはできないと判断し、この投与法を用いた検討を断念し、(4) に示した方法による解析に変更した。

##### (4) 持続静脈内投与法によるメチオニン-ホモシステイン代謝のフラックス解析

安定同位体標識体をトレーサーとして一定の投与速度で持続静脈内投与したとき、トレーサーは内因性成分により希釈され、やがて enrichment が一定となる。定常状態では、代謝プールにおける流入速度と流出速度が等しく、この代謝回転速度は、トレーサーの投与速度と enrichment 値から算出できる。メチオニン-ホモシステイン代謝系は組織 (細胞) 内で起きる反応であるのに対して、観測点は血漿中である。そこで、血漿中の enrichment をもとに組織中に enrichment を求める方法を考案した。これらのことを組合

せ、組織中の代謝回転速度 (DM、RM、TS) と代謝クリアランス ( $CL_{DM}$ 、 $CL_{RM}$  及び  $CL_{TS}$ ) を算出する新しい評価法を構築した。

健常ラット及び全腎の 70~75% を摘除した腎部分摘除ラットに、 $[^2H_7]$ メチオニン及び  $[^2H_4]$ ホモシステインをそれぞれ別個に急速静脈内負荷 + 持続静脈内投与し、代謝クリアランスを求めた。

$CL_{DM}$  は、健常ラット ( $1.7 \pm 0.3$  L/hr/kg) と腎部分摘除ラット ( $1.7 \pm 0.2$  L/hr/kg) に有意差は認められなかった。メチオニンからホモシステインへの代謝過程で行われるメチル基転移反応には非常に多くの酵素系が関与している。それらの酵素は肝臓に比較的多く発現しているものの、種々の臓器に広く分布しているものがあることから、差異が認められなかったものと考えられる。これまでの研究代表者による検討で、腎部分摘除ラットでは、血漿クレアチニン値が  $1.5$  mg/dL を超えると死亡数が増加することが明らかになっている。本研究で用いた腎部分摘除ラットの血漿クレアチニン値 ( $0.56 \pm 0.18$  mg/dL) は健常ラット ( $0.18 \pm 0.01$  mg/dL) に比べて有意に高値を示したものの、まだ予備力が高いことが推測される。このため、腎部分摘除ラットは十分な脱メチル化能を保持していたと推測された。

腎部分摘除ラットの  $CL_{RM}$  ( $3.7 \pm 1.3$  L/hr/kg) は、健常ラット ( $7.2 \pm 1.5$  L/hr/kg) の約 50% に低下した。再メチル化反応には、ベタインホモシステインメチル転移酵素 (BHMT) による系とメチオニンシンターゼ (MS) による系がある。ラットでは、BHMT は肝臓に局在するのに対して、MS は腎に強い活性を有している。このことから、腎実質の減少により MS 活性が低下し、 $CL_{RM}$  が低下したものと考えられた。また、MS 活性の低下に対して BHMT が代償的に働くわけではないことが示唆された。一方、腎部分摘除ラットの  $CL_{TS}$  ( $8.5 \pm 0.5$  L/hr/kg) は、健常ラット ( $9.5 \pm 1.1$  L/hr/kg) に比べて約 10% 低下した。摘出腎を用いた検討ではイオウ転移反応がホモシステインの主たる代謝反応と報告されているが、イオウ転移反応に関するシスタチオニン- $\beta$ -シンターゼやシスタチオニン- $\gamma$ -リアーゼは腎を含む種々の臓器で発現していることから、再メチル化反応に比べてイオウ転移反応への腎実質の減少の寄与が小さかったと考えられた。

以上の結果から、腎実質の減少はホモシステインの再メチル化クリアランスを大きく低下させることが明らかになった。この代謝クリアランスの減少分をメチオニンやホモシステインの濃度を上昇させることで補い、メチオニン-ホモシステイン代謝サイクルの代謝回転を維持しているものと考えられた。

本研究により、腎実質の減少に伴って血漿中のホモシステイン濃度が上昇する機序を示すことできた。ホモシステインの血漿中濃

度上昇が心血管疾患発症・進展にどのように関わっているかを明らかにすることが今後の検討課題である。

## 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 1 件)

Matsukawa T, Hasegawa H, Shinohara Y, Kobayashi J, Shinohara A, Chiba M, Ichida K, Yokoyama K. Simultaneous determination of selenomethionine enantiomers in biological fluids by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3253-3258 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

長谷川 弘、田村優香、重永恵理、松尾和恵、上田麻未、篠原佳彦、市田公美 「腎部分摘除のメチオニン-ホモシステイン代謝サイクルに及ぼす影響」日本アミノ酸学会第 7 回学術大会、2013 年 11 月 2 日、熊本市医師会館 (熊本)

長谷川 弘、田村優香、重永恵理、上田麻未、松尾和恵、篠原佳彦、市田公美 「メチオニン-ホモシステイン代謝サイクルに及ぼす腎部分摘除の影響」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)

長谷川 弘、田村優香、重永恵理、篠原佳彦、市田公美 「5/6 腎摘除ラットにおけるメチオニン-ホモシステイン代謝系の解析」第 56 回日本腎臓学会学術総会、2013 年 5 月 10 日、東京フォーラム (東京)

長谷川 弘、田村優香、重永恵理、上田麻未、松尾和恵、篠原佳彦、市田公美 「腎部分摘除のメチオニン-ホモシステイン代謝サイクルに及ぼす影響」日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜)

重永恵理、長谷川 弘、田村優香、篠原佳彦、市田公美 「安定同位体トレーサー法によるメチオニン-ホモシステイン代謝サイクルの解析」第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012 年 8 月 9 日、慶應大学薬学部芝共立キャンパス (東京)

長谷川 弘、篠原佳彦、田村優香、金子知由、橋本隆男、市田公美 「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の同時定量法の開発」日本分析化学会第 60 年会、2011 年 9 月 16 日、名古屋大学東山キャンパス (名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特になし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

市田 公美 (ICHIDA, Kimiyoshi)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：80183169

篠原 佳彦 (SHINOHARA, Yoshihiko)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00154229

中村 真希子 (NAKAMURA, Makiko)  
東京薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：80447557