

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590042

研究課題名(和文)生活習慣病・慢性腎臓病の新規病態解析のためのNMRメタボロミクス技術の開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of NMR-based metabolomics for a novel diagnostic analysis of chronic kidney disease and life-style related diseases

研究代表者

藤原 正子 (FUJIWARA, MASAKO)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10466534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病・慢性腎臓病の新規な病態解析法を開発するため、腎臓病末期に導入される血液透析患者の代謝変動を血漿と廃液によりNMRメタボロミクスを行った。廃液の測定により治療中の代謝物の時間モニターした結果、クレアチニンの変化と異なり、乳酸、アラニン、ピルビン酸は治療の中間で増加し、透析除去による減少を補償する反応を示した。これら代謝物の変化パターンは患者固有で、原疾患(例えば糖尿病)によって異なることを見出した。

さらに透析治療の合併症としての痙攣にビオチンを投与したところ多くの患者に著効を見た。投与前の血漿中ビオチンをELISA法とLC/MS/MSで測定し痙攣との新しい関係を得た。

研究成果の概要(英文)：For development of new diagnostic analysis for chronic kidney disease, we applied NMR-based metabolomics of plasma and dialysate from patients undergoing hemodialysis (HD). To investigate metabolic responses to HD, we have determined levels of metabolites by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy of dialysate during HD. Unlike the response of creatinine, lactate, pyruvate and alanine exhibited increments at the middle time of HD. The time-course of changes in these metabolites had unique to each patient.

Painful muscle cramp is a common complication of hemodialysis (HD). Oral administration of biotin ameliorated significantly the muscle cramps of HD patients. Then we measured plasma biotin levels at baseline an avidin-competitive assay (ELISA) and LC/MS/MS methods, they revealed significantly higher in patients with cramp than those without cramps. HD patients accumulated biotin than healthy subjects because of their anuric conditions.

研究分野：物理系薬学

キーワード：<sup>1</sup>H NMR メタボロミクス 生活習慣病 慢性腎臓病 乳酸 透析廃液 ビオチン

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や慢性腎臓病は複雑な病因を含んでいるため新規な病態の把握法と解析法が必要とされている。腎臓病は糸球体ろ過量などの指標で病態ステージが分類されるが、進行する病態の把握と予防には十分なものといえず、生活習慣病の増加と相まって患者は増加している。

腎臓病の末期となると血液透析が導入されるが、その後患者は一生隔日の4-5時間の透析治療を行うことになる。透析の要素技術は進歩してきたが、それでも長期治療の間にさまざまな合併症が患者を苦しめる。ことに治療中の激しい痙攣に対して対処療法は試みられているが、基礎的な研究や治療には手をつけられていない

### 2. 研究の目的

我々はNMRメタボロミクス法を用いて、透析患者の病態ひいては腎臓病病態の本質をとらえるための新規解析を行う。さらに、透析合併症としての痙攣に対してメタボロミクスから得られた知見を応用して治療法の開発を試みる。

a) NMRメタボロミクスを用いて、透析治療後に患者血中の乳酸値が増加するという新規マーカーを見出した。これを基礎として透析というストレスに対する患者の代謝応答を検出する。

b) 長期透析治療の間に頻発する合併症としての透析性痙攣について、ピオチン投与を行うことで治療法を探る。血液中のピオチン動態と患者の代謝について解析と研究を行う。

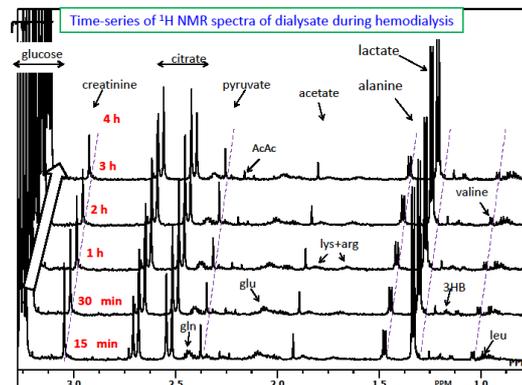
### 3. 研究の方法

a) 透析患者は貧血であり採血は限られるため透析廃液のNMR解析系を構築した。廃液は非侵襲的で治療中でも採取でき、低分子成分のみのためNMR計測での定量分析に適し、分析の再現性もよい。一方従来用いられてきた血液はタンパクや脂質、低分子の混合物であるため定量分析の再現性も不確実である。

b) 透析合併症である痙攣の緩和を目的として水溶性ビタミンであるピオチンを投与し効果の測定を行う。患者(透析患者で痙攣の有無)および健常者の血中ピオチンを測定し、ピオチンの定量を行い、病態およびピオチン効果と結びつける。

### 4. 研究成果

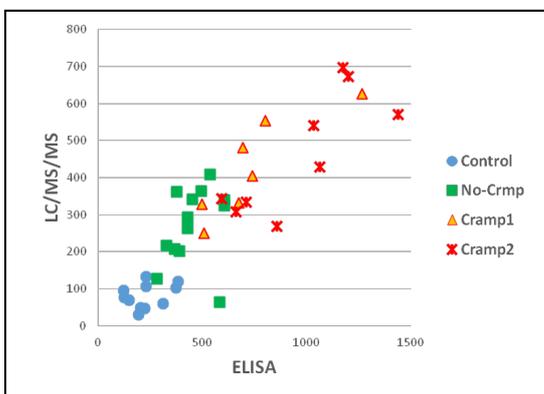
a) 血液と廃液を同時点採取により<sup>1</sup>H NMRスペクトル測定し、乳酸、アラニン、バリン、クレアチニンのピーク定量の比較を行い、血液の代替として<sup>1</sup>H NMR定量分析が可能であることを証明した。内部標準物質としてTSPの妥当性を評価した。廃液NMR法による患者の代謝応答を観察により、個人は再現すること、個人で応答の違いがあること、ことに原疾患によって大きく異なる応答をすることなど医学的な新しい知見を得た。非標的解析NMR法ならではの発見であり、標的でない新たなマーカー群の挙動を見いだした。透析治療中2,3時間くらいで乳酸、ピルビン酸、アラニンが増加しその後最後に向けて下降する(図1)これは生体ホメオスタシスを保つ反応と考えられた。これらがエネルギー産生にかかわる代謝物であり、透析治療は患者のエネルギー代謝に大きな影響を与えたことを示しこれらの結果をまとめて論文化を行った。



(図1)透析治療中の<sup>1</sup>H NMR 廃液スペクトル

b) 上記のことから、透析合併症である痙攣の緩和を目的としてピオチンを投与したところ著効を見た。ピオチンはTCA回路の補

酵素でありエネルギー代謝を改善すること、透析によって低分子であるビタミン類が除去され不足していることが予測されたためである。これを検証するために、血漿中のビオチンをELISA法にて定量したところ、透析患者はビオチンが蓄積していること、ビオチンが効いた患者より効きの悪い患者が見かけのビオチン蓄積が多いことが判明した。予想外の結果であった。そこでLC/MS/MS測定系を立ち上げインタクトビオチンをビオチン類と区別して測定することを試み、これに成功した。腎機能の全廃した患者がビオチンだけでなくその代謝物も体内に蓄積させ、代謝物が活性のあるビオチンを抑制していることが示唆された。ビオチン代謝物と腎臓病との関連を初めて示唆した。(図2)



(図2) 透析患者血漿中ビオチン濃度 (ng/L) 縦横軸はLC/MS/MSによる真性ビオチン、およびELISAでのビオチン類 (ng/L) 健常者11名と透析患者29名(うち痙攣ないもの13名、投与ビオチンの良く効いた痙攣患者7名、効きのわるい痙攣患者9名)

## 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3件)

— M. Fujiwara, I. Ando, K. Takeuchi, S. Oguma, H. Sato, H. Sekino, K. Sato, Y. Imai Metabolic responses during hemodialysis determined by quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. J. Pharm. Biomed. Anal. 2015, 111, 159-162, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.035> (査読有)

— I. Ando, K. Takeuchi, S. Oguma, H. Sato, H. Sekino, Y. Imai, M. Fujiwara.  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopic Quantification of Plasma Metabolites in Dialysate during Hemodialysis,

Magn. Res. Med. Sci. 2013, 12, 129-135 doi: 10.2463/mrms.2012-0076, (査読有)

— S. Oguma, I. Ando, T. Hirose, K. Totsune, H. Sekino, H. Sato, Y. Imai, M. Fujiwara. Biotin ameliorates muscle cramps of hemodialysis patients: A prospective trial Tohoku J. Exp. Med. 2012, 56, 217-223. doi: 10.1620/tjem.227.217, (査読有)

〔学会発表〕(計27件)

藤原正子、安藤一郎、佐藤博、今井潤、竹内和久、根本直、NMRメタボロミクスの透析治療への応用 個別化医療の検討、第14回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2015.2.3、つくば

安藤一郎、藤原正子、小熊司郎、佐藤慶祐、竹内和久 血液透析治療間における患者固有の代謝応答: NMRメタボロミクスによる解析 第43回宮城県腎不全研究会、2014.12.14仙台

藤原正子、安藤一郎、小熊司郎、佐藤慶祐、竹内和久 糖尿病透析患者に特有な透析治療間代謝応答: NMRメタボロミクスによる解析 第43回宮城県腎不全研究会、2014.12.14仙台

藤原正子 糖尿病性腎症の三次予防と個別医療のためのNMRメタボロミクス (招待講演) CBI学会2014大会、2014.10.30 東京

藤原正子 NMRメタボロミクスによる診断支援 腎不全患者の個別化医療に向けて (招待講演) JASIS2014・カンファレンス 2014.9.3 千葉

高橋征三、藤原正子、安藤一郎、今井潤、竹内和久、根本直、 $^1\text{H}$ -NMRメタボロミクスの透析治療への応用--原疾患による代謝特性 第13回産総研産技連LS-BT合同研究発表会 2014年2月18日つくば

Masako Fujiwara, Nobuyuki Takahashi, Itiro Ando, Yutaka Imai, Kazuhisa Takeuchi,  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics of plasma and dialysate from hemodialysis patients 生命医薬情報学連合大会2013.2013.10.29. 東京

安藤一郎、小熊司郎、竹内和久、佐藤博、今井潤、高橋信行、藤原正子、 $^1\text{H}$ -NMRメタボロミクスの透析治療への応用 生理応答の観察、日本薬学会東北支部会、2013.10.20 仙台

藤原正子  $^1\text{H}$ -NMRによる血液透析メタボロミクス 原疾患特異的代謝の検出 (招待講演)、第8回メタボロームシンポジウム、2013.10.4 福岡

高橋征三、今井潤、竹内和久、佐藤博、藤原正子、SEED (Spectral Editing by Extra Dimension) 法によるピーク分離、第41回日本磁気共鳴医学会、2013.9.19、徳島

藤原正子、安藤一郎、竹内和久、佐藤博、今井潤、 $^1\text{H}$ -NMRメタボロミクスの透析治療への応用 その3. 廃液分析による糖尿病患者の代謝応答、第26回バイオメディカル分析化学シンポジウム、2013.8.3 東京

Itiro ANDO, Seizo TAKAHASHI, Kazuhi

- sa TAKEUCHI, Hiroshi SEKINO, Hiroshi SATO, Yutaka IMAI, Masako FUJIWARA, Metabolic profiling by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of plasma and dialysate from patients undergoing hemodialysis. EUROMAR2013、2013.7.4ギリシア国クレタ
- Y. Ono, R. Shinohara, M. Watanabe, K. Yamazaki, K. Kamiyama, M. Sato, S. Kure, Y. Kishida, K. Tamura, T. Nikaidou, M. Kohno, T. Nakayama, M. Fujiwara, M Yokoyama INTRA-OPERATIVE SQUASH PREPARATION CYTOLOGY OF 200 ACOUSTIC SCHWANNOMAS. ICC 2013 第18回国際細胞学会2013.5.27フランス、パリ
- 新川隆朗、藤原正子、安藤 一郎、今井潤、佐藤博、竹内和久、高橋征三、<sup>1</sup>H-NMRによる血液透析メタボロミクスーその1-代謝物ピーク分離定量の新技术、日本農芸化学会、2013、3.25 仙台
- 藤原正子、安藤 一郎、佐藤 博、竹内和久、今井 潤、<sup>1</sup>H-NMRによる血液透析メタボロミクスーその2 - 患者代謝応答の観察、日本農芸化学会、2013、3.25 仙台
- 新川隆朗、高橋征三、安藤一郎、竹内和久、藤原正子、<sup>1</sup>H NMRメタボロミクスの医療応用、第12回産総研産技連LS-BT合同研究発表会 2013.2.6.つくば
- 高橋征三、安藤一郎、今井潤、竹内和久、藤原正子Clinical <sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスの医療応用 その5-脂質の共通因子法によるスペクトル分解、第51回NMR討論会、2012、11.8 名古屋
- Takao Shinkawa, Itiro Ando, Seizo Takahashi, Yutaka Imai, Kazuhisa Takeuchi, Masako Fujiwara, <sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスの医療応用ーその6ー透析治療廃液スペクトルの統計的パターン認識、第51回NMR討論会、2012、11.8 名古屋
- Kazuhisa Takeuchi, Itiro, Ando, Hiroshi Sekino, Masako Fujiwara. Proton-NMR Metabolomics Reveals Impaired Lactate Metabolism in DM-derived HD Patients. Am. Soc. Nephrol. Kidney Week 2012, 2012.11.3 San Diego, USA
- Takao Shinkawa, Itiro Ando, Seizo Takahashi, Yutaka Imai, Kazuhisa Takeuchi, Masako Fujiwara Pattern recognition analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra of plasma and waste-fluid from patients in hemodialysis therapy. 生命医薬情報学連合大会2012, 2012.10.16. 東京
- 21 藤原正子、安藤一郎、今井潤、佐藤博、竹内和久<sup>1</sup>H NMRによる血液透析メタボロミクスー原疾患とエネルギー代謝、第7回メタボロームシンポジウム、2012.10.10、鶴岡
- 22 高橋征三、安藤一郎、竹内和久、藤原正子、Chiral Separation of Lactate in Hemodia-

- lytate. 第40回日本磁気共鳴医学会、2012.9.8. 京都
23. 藤原正子、ノンターゲット分析としての<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクス 透析治療への応用、JASIS2012カンファランス、(招待講演) 2012.9.4 千葉
24. 安藤一郎、竹内和久、佐藤博、藤原正子、<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスの透析治療への応用 - その1. 廃液分析、第25回バイオメディカルシンポジウム2012.8.9、慶応大学 東京
25. 藤原正子、安藤一郎、小熊司郎、今井潤<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスの透析治療への応用 - その2. 生理応答の観察、第25回バイオメディカル分析科学シンポジウム学会、2012.8.9、慶応大学 東京
26. 小熊司郎、藤原正子、安藤一郎、竹内和久、佐藤博、今井潤、関野宏 透析治療における糖尿病患者の代謝応答の特徴、第57回日本透析医学会2012.6.24、札幌
27. 藤原正子、小熊司郎、安藤一郎、佐藤恵美子、佐藤博、今井潤、関野宏、透析患者痙攣症状に対するピオチン投与と血中ピオチン値測定 2012.6.22 第57回日本透析医学会、札幌

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 生体試料中のピオチンまたはその関連物質の測定方法

発明者: 藤原正子、安藤一郎、小熊司郎、八木成明、西澤学、長瀬英生、松澤秀俊

権利者: 東北大学、(医)宏人会、扶桑薬品(株)

種類: 特許

番号: 特願: 2013-262185

出願年月日: 平成25年12月19日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 正子 (FUJIWARA MASAKO)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 10466534

(2) 研究分担者

竹内 和久 (TAKEUCHI KAZUHISA)

東北大学・大学院薬学研究科・分野研究員

研究者番号: 40260426

研究分担者

戸恒 和人 (TOTSHUNE KAZUHITO)

東北福祉大学・総合福祉学部・教授

研究者番号: 10217515

(3)連携研究者  
なし