

## 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：24590178

研究課題名(和文)オミックス統合解析を用いたCKDと人工透析患者のオーダーメイド医療の検討と応用

研究課題名(英文)Development and application of order-made diagnosis using omics-integrated analysis of chronic kidney disease and hemodialysis patients

研究代表者

竹内 和久 (TAKEUCHI, KAZUHISA)

東北大学・薬学研究科(研究院)・分野研究員

研究者番号：40260426

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):CKD(慢性腎臓病)と人工透析患者のオーダーメイド医療法を開発するため、血液透析患者の代謝変動を血漿と廃液のNMRメタボロミクス解析を行った。治療中時間モニターを行い、乳酸、アラニン、ビルビン酸は治療の途中で増加するなど、変化は患者固有のパターンが再現すること、原疾患(例えば糖尿病)などによって異なることを見出した。

透析合併症である痙攣(フェノーム)程度の数値化に成功した。血中ビオチンの基礎値をELISA法で測定したところ痙攣患者はビオチンが蓄積していること、ビオチンの効き具合(フェノーム)とビオチン代謝物濃度との関係も示唆するデータを得た。いずれもオーダーメイド医療に繋がるものである。

研究成果の概要(英文):For development of order-made diagnosis for chronic kidney disease and hemodialysis (HD) patients, we applied omics-integrated analysis of plasma and dialysate from HD patients. 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 was unique to each patient.

Muscle cramp is a common complications of HD. We defined score of the cramps and measured the effects of oral administration of biotin to cramps. We measured plasma biotin levels of the patients before prescribed biotin by ELISA methods, and found they were dependent on the efficacies of prescribed biotin. The fact of fenome (cramp scores) and metabolome (biotin levels) were correlated may provide information to the order-made diagnosis of HD patients.

研究分野：医療系薬学

キーワード：<sup>1</sup>H NMR メタボロミクス CKD 透析患者 透析廃液 フェノーム 透析痙攣 ビオチン

1. 研究開始当初の背景

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

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。オーダーメイド医療を目的として患者固有の代謝反応を特定し、原疾患と結びつける。

さらにフェノーム研究として、透析患者の合併症の数値化を試みる。ビタミンの投与実験を行うことで薬効すなわち症状の変化の数値化も試み、メタボロームの変化と結びつける。

3. 研究の方法

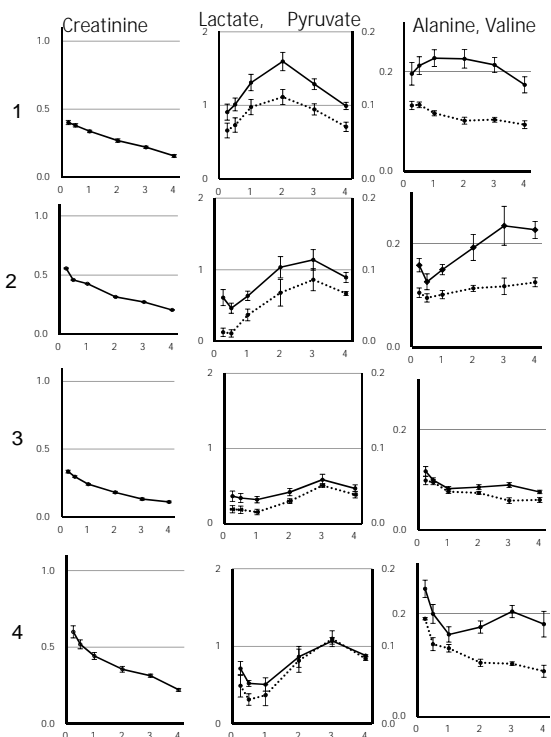
a) 透析患者は貧血であり採血は限られるため透析廃液のNMR解析系を構築した。廃液は非侵襲的で治療中でも採取でき、低分子成分のみのためNMR計測での定量分析に適し、分析の再現性もよい。一方従来用いられてきた血液はタンパクや脂質、低分子の混合物であるため定量分析の再現性も不確実である。

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ビ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ビオチンを測定し、

ビオチンの定量を行い、病態およびビ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、代謝物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観察を行った。図に示すよう、クレアチニン、乳酸、ピルビン酸、アラニン、バリンの個人は再現すること、個人で応答の違いがあること(図1)、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。オーダーメイド医療への展望を与えるものである。非標的解析NMR法ならではの発見であり、標的に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。これは生体ホメオスタシスを保つ反応と考えられた。



(図1) 透析中の血中代謝物濃度(mM)4名の例 左からクレアチニン、中は乳酸(実線

左軸) ピルビン酸(破線、右軸)、左図はアラニン(実線)ヴァリン(破線)

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、血漿中のピオチンをELISA法にて定量したところ、透析患者はピオチンが蓄積していること、ピオチンが効いた患者より効きの悪い患者が見かけのピ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。ELISA方がピオチン骨格を持つ代謝物も測定することを考慮すると、腎機能の全廃した患者がピ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ピオチンを抑制していることが示唆された。これもピオチン活性を調べる事でさらに、個別の患者の代謝特性を明らかにする可能性がある。オーダーメイド医療という点でもピオチン活性と腎臓病の関連は新しい問題提起となる。

#### 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 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 <sup>1</sup>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, Hi Sato, H. Sekino, Y. Imai., M. Fujiwara. <sup>1</sup>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. Totsume, 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メタボロミッ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メタボロミックスによる解析 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メタボロミックスによる解析 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メタボロミックス(招待講演) CBI学会2014大会、2014.10.30 東京
- 藤原正子 NMRメタボロミッ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、<sup>1</sup>H-NMRメタボロミッ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, Kazuhiisa Takeuchi, <sup>1</sup>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、<sup>1</sup>H-NMRメタボロミッ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 <sup>1</sup>H-NMRによる血液透析メタボロミックス 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、<sup>1</sup>H-NMRメタボロミッ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, Kazuhiisa 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. EUROM AR2013, 2013.7.4ギリシア国クレタ
- 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手法、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年2月6日つくば  
戸恒和人、廣瀬卓男、藤原正子、関野宏、佐藤博、高橋和広、今井潤、ヒト血中プロレニン受容体様免疫活性物質の検討。第18回日本心血管内分泌代謝学会 2013.11. 22 大阪  
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, Kazuhiisa 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  
Kazuhiisa 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, Kazuhiisa 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 Hemodialysate. 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シンポジウム 2012.8.9、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
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
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
- (2)研究分担者  
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
- 研究分担者  
戸恒 和人 (TOTSUNE KAZUHITO)  
東北福祉大学・総合福祉学科・教授  
研究者番号：10217515
- 研究分担者  
佐藤 恵美子 (SATO EMIKO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：20466543
- (3) 連携研究者  
なし