

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790832

研究課題名(和文)慢性腎臓病患者予備群への低侵襲早期診断マーカーの探索と検討

研究課題名(英文)Exploration of less-invasive biomarkers for chronic kidney disease

研究代表者

佐藤 恵美子(Sato, Emiko)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20466543

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):腹膜透析では、生命予後に残存腎機能が大きく寄与する。そのため、残存腎機能の評価が腹膜透析にとって重要な課題である。本研究では、腹膜透析患者の血液検体および腹膜透析排液を対象とし、尿毒症物質をLC-MS/MSで測定を行い、臨床パラメータと比較を行い、残存腎機能の指標となる化合物の探索を行った。その結果、グアニジン化合物であるメチルグアニジンおよびタンパク結合型尿毒症物質であるインドキシル硫酸の血中濃度が、残存腎機能に依存して変化していた。このことから、これらの物質が指標の候補と考えられる。また、これらの血中濃度が体内筋肉量と関連が認められ、筋肉に何らかの影響を与えている可能性が示された。

研究成果の概要(英文):Residual renal function is an important predictor of 1-year mortality in chronic kidney dialysis patients. In this study, we explored the biomarker of residual renal function (RRF) in peritoneal dialysis patients (PD). Sixteen PD patients (64 ± 11 years, men:10, women:6) were intended to this study. Blood and PD fluids sample were collected in peritoneal equilibration test (PET). Seventeen uremic toxins were quantified by LC-MS/MS. Relationship between plasma uremic toxin concentration and clinical parameters, RRF and lnBody data was evaluated. From the results, plasma indoxyl sulfate (IS) and methylguanidine (MG) increased in PD patients in parallel with loss of RRF, but not peritoneal function. Furthermore, plasma concentrations of IS and MG were significantly correlate with body muscle mass. Our data suggested that plasma concentrations of IS and MG were increased with loss of RRF and they affect body muscle.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：慢性腎臓病 栄養障害 腹膜透析 尿毒症物質 残存腎機能

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病である高血圧や糖尿病が増加しており、その結果透析導入患者数が増加している。透析治療は一度導入すると生涯継続しなくてはならず、患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる。わが国の慢性透析患者は日本透析医学会の統計調査によると2009年末には29万人に達したと報告されている。さらに毎年1万人前後で増え続けており、2010年には約30万人となった。慢性腎臓病(CKD)患者は、日本の成人人口において1330万人と推定され、世界的にみても顕著に増加している。透析導入患者の中で最も多い原疾患は糖尿病の3大合併症の一つである糖尿病性腎症である。透析患者数が増加の一途を辿っているため、透析治療にかかる医療費も増加しており、医療費を抑制する対策が必要である。このために、腎障害を早期発見し、症状を悪化させないように早期治療を行い、透析導入患者を1人でも少なくすることが世界的に重要視されている。

2. 研究の目的

CKDは末期腎不全や心血管疾患のみならず全死亡のリスクが高いと報告されている。慢性腎不全による、末期腎不全に至った場合は回復の可能性がなく、尿毒症や高カリウム血漿・心不全等の重大な問題を起こすので、透析や移植をする以外に方法がない。近年、生活習慣病である高血圧や糖尿病の増加により、国民病といわれるほどCKD患者が増加し、そのうち毎年1万人程度が透析導入に至っている。腹膜透析は在宅医療であり、循環動態に影響を与えにくく、臓器保護効果が強い利点があるが、生命予後に残存腎機能が大きく寄与することや腹膜劣化による透析期間の制限があることに難がある。腹膜透析の導入基準は、腎機能だけで言うと、大体10%以下程度の腎機能で透析や移植が必要となる。さらに、腹膜透析においては残存腎機能が生命予後に関与しているといわれている。これらのことから、残存腎機能および腹膜機能の評価が腹膜透析にとって重要な課題となっている。本研究は、腹膜透析患者を対象とし、

LC-MS/MSを用いて腹膜機能の評価および残存腎機能の評価指標を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究の対象者は、東北大学病院 腎高血圧内分泌科に通院中の、腹膜透析治療を行っている患者である。このうち、死亡、血液透析移行、腹膜透析平衡試験(peritoneal equilibration test; PET)3回未満を除外した16名を対象とした。対象者のPET時の腹膜貯留0時間(D0)、2時間(D2)、4時間(D4)の腹膜透析排液、PET2時間後の血液(P)、PET前の尿を回収した。回収したサンプルの、尿毒症物質はLC-MS/MSで測定した。さらに、レニン・アンジオテンシン系(RAS)構成因子である可溶性プロレニン受容体[s(P)RR]、炎症の指標であるMCP-1はELISAで測定を行った。腹膜透析排液中および血液中のそれぞれの濃度と、臨床パラメータ、InBody測定体成分分析データとの関連について、統計解析を行った。

4. 研究成果

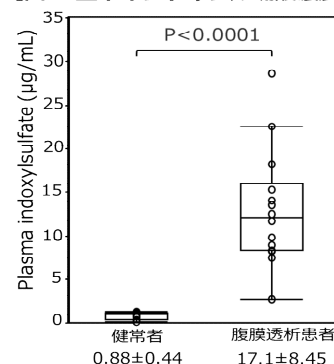
本研究では、17種類(タンパク結合型尿毒症物質およびグアニジノ化合物)の尿毒症物質をLC-MS/MSで測定し、臨床パラメータおよびInBodyデータとの関連を検討した。

以下、タンパク結合型尿毒症物質とグアニジノ化合物の結果を分けて報告する。

【タンパク質結合型尿毒症物質】

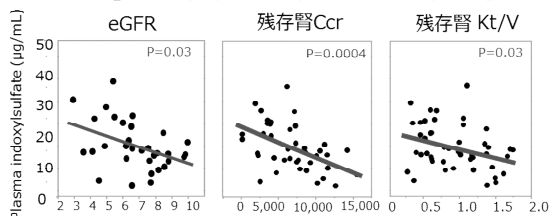
タンパク質結合型尿毒症物質として、本研究ではインドキシル硫酸(IS)を対象に測定を行った。ISは腹膜透析患者の血中で、有意に上昇していた(図1)。

【図1. 血中インドキシル硫酸濃度】



また、血中 IS 濃度は 3 種類の異なる腎機能評価と負の相関を示した (図 2)。

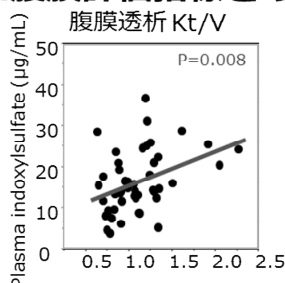
【図2. 腎機能評価指標との関連】



一方、血中 IS 濃度は、腹膜透析指標とは負の相関を示しており、これは腹膜の透析量を増やしても血中 IS は減少しないことを示している (図 3)。

これらの結果から、血中インドキシル硫酸は腎機能

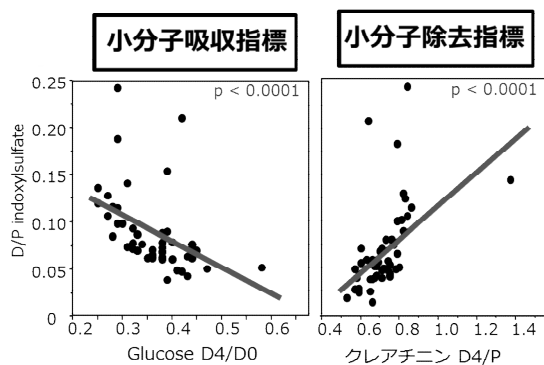
【図3. 腹膜評価指標との関連】



に依存していることが分かった。

次に、インドキシル硫酸の腹膜透過性について調べた (図 4)。腹膜透過性は、小分子除去能はクレアチニン D4/P、小分子吸収能はグルコース D4/D0 で表すことができる。

【図4. ISの腹膜透過性】



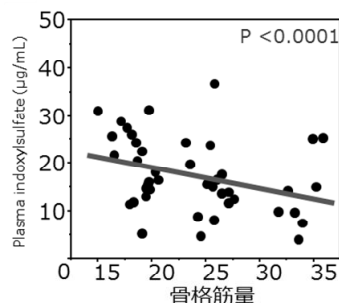
ISの腹膜透過性は、小分子除去指標と正の相関が認められたことから、タンパク結合型尿毒症物質である IS は、腹膜を介して除去されていることが分かった。しかし、クレアチニンと比較するとクリアランスは 2 割程度であった。

さらに腹膜透析の指標と血中 IS の関係を調べた。

その結果、血中 IS は残存腎機能の指標と負の相関が認められ、このことは、血中 IS は残存腎機能に依存して体内に蓄積していることを示している。

次に、体成分データとの関連を調べた (図 5)。

【図5. 骨格筋量との関係】



その結果、血中 IS は体重、筋肉量、骨格筋量、脂肪量、水分量に負の相関が認められた。つまり、血中 IS 濃度が高い程、筋肉量が減少していることを示唆している。

【グアニジノ化合物】

さらにクレアチニンを含むグアニジノ化合物および関連代謝物の 15 種類の一斉分析を行った。その結果、クレアチニン、尿素、グアニジン、メチルグアニジン (MG)、グアニジノコハク酸 (GSA)、アルギニノコハク酸 (ASA) が腹膜透析患者の血中で有意に上昇していた。

これらのグアニジノ化合物の中でも、残存腎機能と最も関係する化合物を重回帰分析で調べた。その結果、MG とグアニジンが残存腎機能に関与していることが分かった。MG は、クレアチニンの分解代謝物で毒性があることから、本研究では MG に着目した。

図 6 に血中 MG の比較を示した。

【図6. 血中メチルグアニジン濃度】

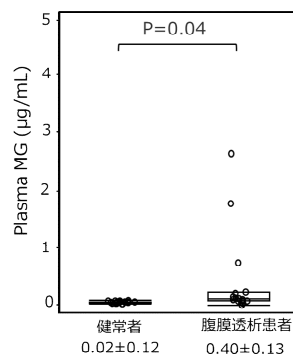
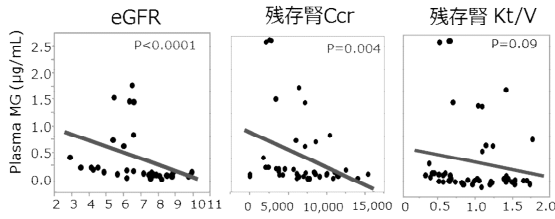
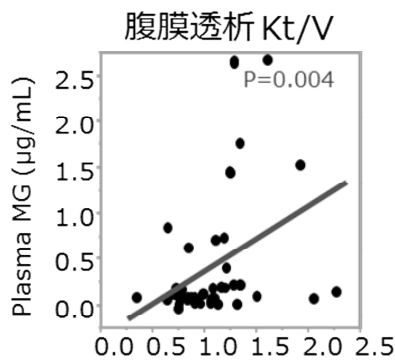


図7 残存腎機能指標、図8に腹膜機能指標との関連を示した。

【図7. MGと残存腎機能指標の関連】

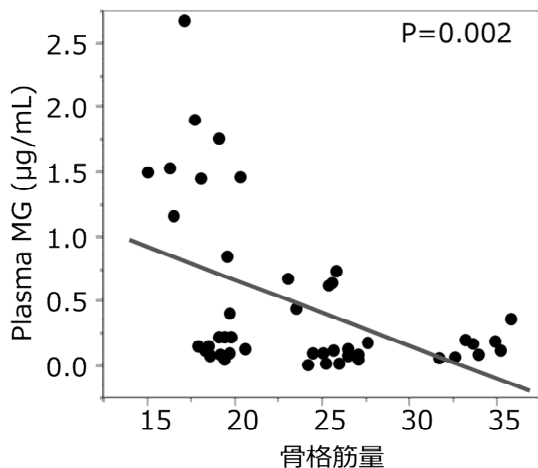


【図8. MGと腹膜機能指標】



血中 MG も IS と同様に、腹膜透析量を増やしても減少しておらず、腎機能に依存していることが分かった。さらに、MG は IS と同様に、骨格筋量と負の相関が認められた (図9)。

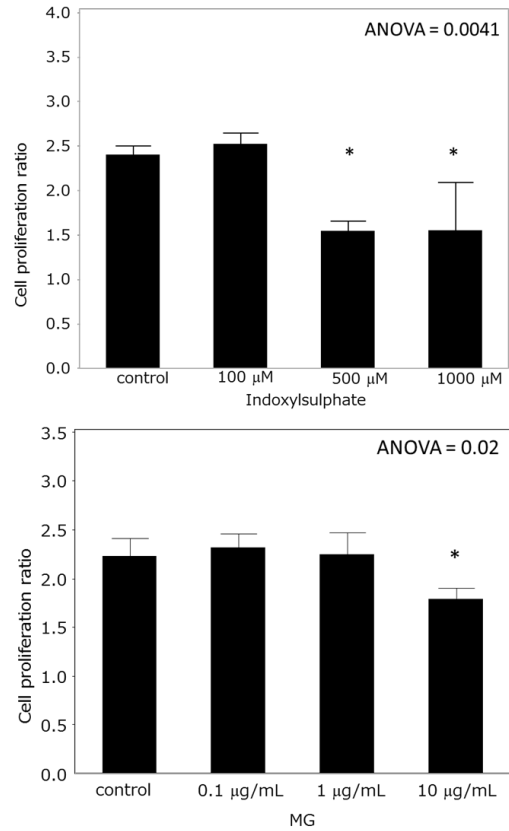
【図9. MGと骨格筋量】



これらの結果から、腎機能の低下に伴い、体内蓄積した IS と MG が骨格筋の増殖を抑制している可能性が考えられた。この可能性を検証するため、マウス骨芽細胞由来の C2C12 を用いて、IS と MG による細胞増殖への影響を検討した。

その結果、IS または MG 存在下で C2C12 の増殖抑制が認められた。

【図10. ISとMGの影響】



以上の結果から、本研究では血中 IS、MG 濃度が腎機能を反映しており、また腎機能が低下することで蓄積した IS や MG が骨格筋量の増殖に影響を与え、腎不全患者における筋肉の衰えに関与していることを示した。

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)

Kaori Narumi, Takuo Hirose, Emiko Sato, Takefumi Mori, Kiyomi Kisu, Mayuko Ishikawa, Kazuhito Totsune, Tomonori Ishii, Atsuhiro Ichihara, Genevieve Nguyen, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito.

“A functional (pro)renin receptor is

expressed in human lymphocytes and monocytes.” Am J Physiol Renal Physiol. , 査読有, 2015, 308(5), pp. F487-99 doi: 10.1152/ajprenal.00206.2014.

Saki Iwamori, Emiko Sato, Kouichi Yoshinari, Nariyasu Mano, Sadayoshi Ito, Hiroshi Sato, Nobuyuki Takahashi. “A novel and sensitive assay of kidney heme oxygenase activity”

Nephrology, 査読無, 2014, 19, pp. 185

Emiko Sato, Takefumi Mori, Yoshimi Nakamichi, utsuko Fujiwara, Ikuko Oba, Mizuho Tanno, Susumu Ogawa, Yoshitaka Kinouchi, Hiroshi Sato, Wataru Hida, Sadayoshi Ito. “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, pp. 53-60.

〔学会発表〕(計5件)

佐藤恵美子, 森建文, 菅原真恵, 大場郁子, 小泉賢治, 千田真貴子, 永沼絵理, 佐藤博, 伊藤貞嘉: 腹膜透析におけるインドキシル硫酸クリアランスに及ぼす因子の検討. 第39回日本医用マスペクトル学会年会, 千葉, 2014年10月16日

佐藤恵美子, 森建文, 三枝大輔, 菅原真恵, 大場郁子, 小泉賢治, 千田真貴子, 永沼絵理, 佐藤博, 伊藤貞嘉: 腹膜透析におけるグアニジノ化合物の臨床的研究. 第35回グアニジノ化合物研究会, 筑波, 2014年10月11日

佐藤恵美子, 森建文, 中道淑美, 大場郁子, 佐藤博, 飛田渉, 伊藤貞嘉: 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学会, 東京, 2012年11月23日

佐藤恵美子, 森建文, 米城淑美, 大場郁子, 伊藤貞嘉, 飛田渉: 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, 大阪, 2012年5月12日

佐藤恵美子, 森建文, 鈴木深作, 芦毅, 石川繭子, 後藤貴章, 佐藤博,

大江知行, 伊藤貞嘉: LC/MS/MSによる生体内アンジオテンシン代謝物の測定法の開発. 第85回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012年4月19日

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤恵美子 (EMIKO SATO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 20466543