

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659065

研究課題名(和文)腎臓病におけるビオチン・エピジェネティクスを指向したNMRメタボロミクス研究

研究課題名(英文)NMR-based metabolomics research for epigenetic regulation by biotin in renal disease

研究代表者

高橋 征三 (TAKAHASHI, SEIZO)

東北大学・薬学研究科(研究院)・分野研究員

研究者番号：00011693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病患者の血中のビオチン(ビタミンH)濃度を測定したところ、健常者より高値であることを見出した。腎臓機能の低下した患者はビオチンだけでなくその代謝物を尿に排泄できずに血中に蓄積していることを意味している。この代謝物はビタミンとしての活性がないだけでなく、元のビオチンの活性を妨げることが言われている。

腎臓病患者にとって慢性的な代謝物の蓄積は、病態を進行させるなど深刻な影響を与える。そこで活性のある元のビオチンと活性のなくなったビオチン代謝物を区別して測定する方法を開発した。さらにNMR(磁気共鳴)法を用いて慢性患者に特有の代謝を解明することにより、治療への道を拓きたい。

研究成果の概要(英文)：We measured plasma biotin concentrations in hemodialysis patients by the ELISA method. The biotin concentrations in the patients were higher than that in the normal subjects. The ELISA detects all the molecules with biotin-backbone structures. The results indicated that renal disease patients without uric excretion accumulate biotin and biotin-metabolites in the blood. It was suggested the metabolites have no activity as vitamins, and disturb intact biotin. Chronic disease patients are affected seriously by the accumulated metabolites.

For identification and quantification of biotin and the metabolites, we developed the LC/MS system.

By NMR measurement of the plasma and spent dialysate samples from the patients, we study metabolic features special to chronic disease patients for the novel diagnosis.

研究分野：薬物代謝

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：メタボロミクス ビオチン代謝物 慢性腎臓病 ELISA法 LC/MS法 NMR法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性疾患におけるエピジェネティクスの重要性：生活習慣病や慢性腎臓病 (CKD) などの慢性疾患にはエピジェネティックな影響がさらに疾患を憎悪させていることが注目され始めた

(2) NMR(磁気共鳴)を用いたメタボロミクス法：我々は本邦で唯一開発者であり臨床応用でもトップである。MS(質量分析)法と違って、予め標的を定めない解析は未知なマーカーの抽出が見込める点で、特に CKD など複合疾患の解析に有用である。透析廃液の NMR により乳酸/ピルビン酸比が健常者より有意に高く、患者のエネルギー代謝の偏りを発見した。われわれはピルビン酸とエネルギー生産系 TCA 回路をつなぐ反応の補酵素であるピオチンの不足を想定し、透析中痙攣のある患者にピオチンを経口投与しところ痙攣に著効を示した。

(3) ピオチン服用前の透析患者の血中ピオチン量測定：アビジン拮抗 ELISA 法にて測定したところ、予想に反して健常者より有意に蓄積していることが判明した。ELISA 法はピオチン骨格を持つものすべて(ピオチンだけでなくその代謝物も)を定量する。このことから蓄積した代謝物がピオチン酵素活性を阻害したことが示唆されると我々は考えた。

(4) 腎臓病とピオチン代謝物：健常者でのピオチンとその代謝物の濃度は血液ではピオチンの割合が多く、一方尿には代謝物が排出されていることが先行研究で知られている。ところが尿排泄が滞ると多種の代謝物が血中に残留する。腎臓の排泄と再吸収機能の劣化に伴って、代謝物の慢性的累積がエピジェネティックレベルまで影響を及ぼすことを上記の我々の検討から着想した。

## 2. 研究の目的

・末期腎不全患者の血液と尿中のピオチンおよびその代謝物の分離と定量を行い、病態と

の関連を研究する。腎臓病の進行とピオチンと代謝物の分布の相関を調べることで、ピオチン代謝物が病態進行のマーカーとなるか検討する。慢性病において難分解性代謝物の代謝動態を調べ、エピジェネティックな影響を与えるかを考察する。

## 3. 研究の方法

・末期腎不全患者である透析患者の血漿と廃液を用い、ピオチン(活性ある未変化体)とピオチン代謝物を分離定量する。健常者との比較を行う。

(1) まず、ピオチン骨格をもつ全ピオチン類をアビジン拮抗法 ELISA によって測定する。

(2) 次に患者検体において未変化体ピオチンとその代謝物を分離同定し、定量する LC/MS 測定系を構築する。

(3) ピオチン代謝物として、ピオチンスルホン、ピオチンスルフォキシド、ビスノルピオチンの各々の合成をおこなう。とくに多量に含まれるビスノルピオチンを新規合成する。これによって患者検体に各代謝物が実際にあるのか、同定と定量を LC/MS 系を用いて行う。

(4) さらに NMR スペクトルのパターン認識を用いて、ピオチンの関与するエネルギー、糖、脂質代謝のプロファイルを病態分類と対応付け、標的代謝物と酵素を導出する。

## 4. 研究成果

(1) 透析患者 27 名と健常者 13 名の ELISA によるピオチン定量の結果、透析患者血漿中に有意に高値を示したこと、また透析合併症であるけいれんなどを持つ患者は持たない患者と比較しても有意に高値を示した。(論文 2012 年)このことは全ピオチン類が患者に蓄積していることを初めて示したものである。合併症の考察からピオチンは活性ピオチンのみならず、代謝物が蓄積し、代謝物が活性を阻害しているとの仮定を立てた。

(2) 透析患者の血中のピオチンを同定定量する LC/MS 系を開発した。健常者血中においてピオチンは同定定量されてきたが、新規に透析患者血漿において試みたところ、イオン化における妨害ピークが多くマトリクス効果のため同定と定量は困難であった。これをカラムの選定や分析条件などの技術開発により可能とした。(特許出願 2013)。これにより未変化体活性ピオチンだけの定量が患者血漿において可能となり新たな知見を得た。(未発表)

(3) ELISA によってピオチン類全体の定量値が、LC/MS によって活性ピオチンだけの定量値が得られたわけで、ELISA 値から LC/MS 値を差し引いたものが代謝物の定量値となる。

実際に患者検体に蓄積する代謝物を同定するため、次のステップに移った。LC/MS による定量に標品が必要になるが、各代謝物のうちまず、ピオチンスルホン、スルフォキシドの合成を東北大学ナノテク融合技術支援センターに依頼した。これはピオチンを酸化することで比較的簡単に合成が出来た。これらスルホン体を患者検体中での同定を試みたが、困難であり同定は出来なかった。そこで、次に代表的なビスノルピオチンについて東北大ナノテクセンターに合成を依頼した。ナノテクセンターでは独自の反応ステップを開発し、ビスノルピオチンの合成に成功した。さらに LC/MS でビスノルピオチンを定量するためにはこの同位体標識物が必要となる。現在この作成を依頼しナノテクセンターにおいて進行している。一方、ビスノルピオチンの合成がひとまず成功したのでこれを用いて患者血漿でビスノルピオチンの同定を行っている。

(4) われわれは透析患者検体の NMR スペクトルによる解析法の基礎として、血漿サンプルと同時に採取した廃液を用いて代謝物定量を評価した。(論文 2013 年) 廃液の NMR スペクトルによって患者特性が明瞭に区別さ

れ、エネルギー代謝関連の代謝物挙動を把握した。ピオチンとエネルギー代謝との関連、あるいはエビジェネティクスに関する解析は当初の目的に照らして不十分であったが、今後の解析の基礎を構築することができた。

## 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 2 件)

I. Ando, K. Takeuchi, S. Oguma, H. Sato, H. Sekino, Y. Imai, M. Fujiwara. <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Quantification of Plasma Metabolites in Dialysate during Hemodialysis. 2013, Magn. Reson. Med. Sci. 12. 129-135. 査読あり doi:10.2463/mrms.2012-0076

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. 2012, Tohoku J. Exp. Med. 227. 217-223. 査読あり doi 10:1620/tjem.227.217

[学会発表](計 2 2 件)

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, <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, Kazuhisa TAKEUCHI, Hiroshi SEKINO, Hiroshi

i SATO, Yutaka IMAI, Masako FUJIWARA, Metabolic profiling by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of plasma and dialysate from patients undergoing hemodialysis. EUROMAR2013, 2013.6.30-7.5ギリシア、クレタマリホテル

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

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 Imai1, 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, 2 12.11.3 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

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

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

藤原正子、ノンターゲット分析としての<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスー透析治療への応用、JASIS2012カンファランス、(招待講演) 2012.9.4 千葉

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

分析科学シンポジウム学会、2012.8.8、東京  
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26回バイオメディカル分析化学シンポジウム 2012.8.8.東京

藤原正子、安藤一郎、竹内和久、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、2012.8.8、東京

21 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、第57回透析医学会、2012.6.23 札幌

22 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回透析医学会、2012.6.23 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔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 外2名

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：2013.12.19

国内外の別：国内

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

高橋 征三 (TAKAHASHI SEIZO)

東北大学・大学院薬学研究科・分野研究員  
研究者番号：00011693

(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

高橋 信行 (TAKAHASHI NOBUYUKI)  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号： 40588456

(3) 連携研究者

竹内 和久 (TAKEUCHI KAZUHISA)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号： 40260426