

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09382

研究課題名(和文)新規糖尿病血管合併症バイオマーカーとしての尿中NAD代謝産物の臨床的有用性の検証

研究課題名(英文)The role of urinary NAD metabolites as new biomarkers for diabetic vascular complications

研究代表者

荒木 信一 (Shin-ichi, Araki)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80378455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性血管合併症、特に腎症の早期発症と新たな治療戦略の探索のため、2型糖尿病患者の新たなバイオマーカーとして尿中NAD代謝産物に着目し、その尿中排泄量と、NAD代謝に関連する遺伝子の一塩基多型の頻度と腎症との関連を検証することを目的に研究を行った。HPLC-MS/MS法にて測定した尿中NAD代謝産物のうち、尿中NAD⁺排泄量と尿中NMN排泄量が腎機能と強い正相関関係を示した。また、NAD代謝に関連するNNMT遺伝子の一塩基多型・ハプロタイプが腎症を合併する症例で非合併例に比べ高頻度に認められ腎症との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of urinary NAD metabolites as a new biomarker for diabetic vascular complications, especially nephropathy. In addition, we investigated the association between SNPs of NAD-related genes and diabetic nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. As a result, urinary excretion levels of NAD⁺ and NMN were statistically correlated with eGFR. In addition, the allele frequencies of SNP and haplotypes in NNMT gene were significantly different between patients with diabetic nephropathy and those without it in the cross-sectional study, suggesting a relationship with nephropathy of NNMT gene.

研究分野：内科

キーワード：糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の生命予後・生活の質を維持・改善させるためには、糖尿病に関連する血管合併症の発症・進展を阻止することが重要である。特に腎症は、透析療法導入患者の主要原疾患であり、腎症の発症・進行を抑制することは、医療経済の観点からも重要な医療課題である。現在、腎症は、微量アルブミン尿の出現により早期腎症と診断される。その後、顕性蛋白尿、腎機能低下、末期腎不全へ進行する経過をとる。また、微量アルブミン尿の出現は、将来の末期腎不全への進行予知因子であるのみならず、心血管イベント発症の独立した危険因子であることが多くの臨床疫学研究により明らかにされている。このような腎症の進行過程は、従来、不可逆かつ進行性であると考えられていたが、リスク因子を包括的管理する集約的治療により、正常アルブミン尿期への寛解が高頻度で生じること (Araki S et al. Diabetes 2005)、さらに、微量アルブミン尿を寛解させることができれば、将来の心血管イベントの発症率を有意に減少させ、腎機能低下が抑制されることを我々はこれまで報告してきた (Araki S et al. Diabetes 2007)。このような一連の臨床疫学研究の結果、糖尿病における微量アルブミン尿の改善は、糖尿病患者の生命予後の改善ならびに血管合併症発症・進行阻止のための重要な治療目標であると考えられるようになった。しかしながら、アルブミン尿を有さずとも合併症が進展する症例や、集約的治療を施したにも関わらず、アルブミン尿の改善がもたらされない症例が未だ存在することも事実である。そこで、アルブミン尿で予測し得ないリスクを判別できる新規臨床指標、アルブミン尿よりも早期に、合併症リスクを判断しうる新規臨床指標の開発が望まれている。

これまでの基礎研究から、糖代謝異常に伴う細胞内 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) の代謝異常、特に NAD⁺

濃度の低下が合併症の発症・進展に影響を及ぼす可能性が示唆されている。研究代表者も、その分子基盤として、NAD⁺により活性が制御されている NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 Sirtuin の活性化が腎症の病態に関与していることを報告してきた (Kume S et al. J Clin Invest 2010, Kume S et al. Diabetes 2012)。これらの成績より、NAD⁺は細胞内酵素の活性制御を介し細胞内代謝を制御する生理活性物質であるのみならず、糖尿病血管合併症、特に腎症の発症・進展に深く関与している可能性が考えられる。しかしながら、これまでに NAD⁺代謝関連分子の尿中排泄濃度と糖尿病性血管合併症に関する臨床的エビデンスは報告されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、日本人 2 型糖尿病患者における血管合併症リスクを予測しえる新規臨床指標として NAD⁺代謝異常に着目し、NAD⁺代謝関連分子の尿中排泄量と血管合併症の発症・進展、特に腎症の発症との関連を検討する。また、NAD⁺代謝に関連する遺伝子の一塩基遺伝子多型 (SNP) 頻度と腎症との関連、さらに、これら SNP と NAD⁺代謝関連分子の尿中排泄量との関連性について検討を行うことを目的とする。

これら腎症病期と NAD⁺代謝関連分子の尿中排泄濃度との関連を検証することより、血管合併症発症のハイリスク糖尿病症例の早期同定と、個々の症例背景に応じた適切な治療法の選択を探索し、個別化医療による糖尿病患者の血管合併症の発症阻止に向けた新たな糖尿病治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

尿中 NAD 代謝産物量の測定:

滋賀医科大学倫理委員会の承認のもと、滋賀医科大学で実施している糖尿病長期前向き経過観察研究に参加されている 2 型糖尿病患者の長期保存尿検体 (-80 保存) を用いて、尿中 NAD 代謝産物量を HPLC-MS/MS 法により測定

する。測定産物としては、図1（黒ボックスで測定対象産物を示す）に示すNAD代謝マップに存在するNAD⁺、NADH、Nicotinamide、NMN (nicotinamide-nucleotidephosphoribohydro lase)、1-MNA (1-Methylnicotinamide)の5種類の代謝産物を定量測定する。

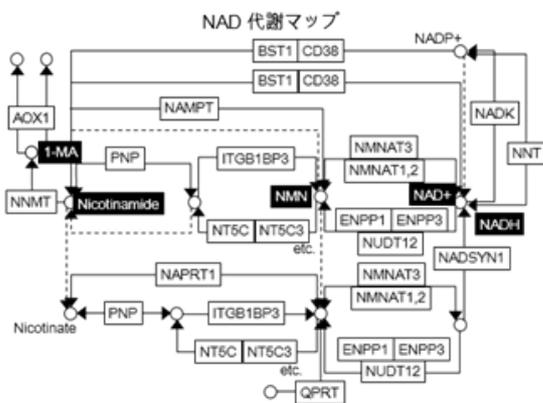


図1 . NAD 代謝マップ

HPLC-MS/MS法にて測定した尿中NAD代謝産物濃度と尿中クレアチニン濃度との比を、尿中NAD代謝産物排泄量(/g Cr)として解析に用いる。

解析方法：

2群間比較 (Student t 検定 あるいは Mann-Whitney U 検定)

各種臨床パラメーターとの相関分析 (Pearson相関係数あるいはSpearman順位相関係数)

解析ソフト：IBM SPSS ver22

遺伝子関連研究：

NAD⁺代謝に関連すると考えられる INMT, NNMT 遺伝子の SNPs 解析(解析対象 SNPs を図2に示す)を、日本人2型糖尿病患者を対象に実施し、各 SNPs のアレル・遺伝子型頻度、ならびにハプロタイプ構造とハプロタイプ頻度を同定する。その後、腎症合併群(微量アルブミン尿期以上の腎症病期かつ網膜症あり)と非合併群(正常アルブミン尿期かつ網膜症無し)の2群による症例対照関連解析にて比較する。

遺伝子	rsID	アレル1	アレル2
INMT	rs6959671	C	T
INMT	rs2075005	A	G
INMT	rs2302339	T	C
INMT	rs2302340	A	G
INMT	rs1061644	C	T
NNMT	rs11214936	G	T
NNMT	rs4646335	A	T
NNMT	rs2256292	G	C
NNMT	rs2301128	A	G
NNMT	rs1941404	C	T
NNMT	rs1894030	C	T
NNMT	rs10891645	A	C
NNMT	rs2155806	C	T
NNMT	rs11214938	A	G
NNMT	rs1894032	C	A
NNMT	rs17116804	C	T
NNMT	rs12224177	G	T
NNMT	rs2604279	C	T
NNMT	rs2852447	A	G

図2 . 解析に用いた SNPs

4 . 研究成果

尿中NAD代謝産物量の測定：

現在までに測定した5つの尿中NAD代謝産物排泄量において、NAD⁺(平均値±標準偏差：39.4±14.3 nmol/g Cr)、NADH(81.3±27.5 nmol/g Cr)、Nicotinamide(11.0±5.5 μmol/g Cr)、NMN(136.6±73.9 nmol/g Cr)の4産物はすべての尿サンプルで測定感度内にて測定可能であった。しかしながら、尿中1-MNA排泄量(中央値[4分位]:303.6 nmol/g Cr [92.2-8355.9])は、47%の尿サンプルで測定感度(検出下限値1 nmol/L)以下であった。

腎症病期別(正常アルブミン尿期 vs 顕性蛋白尿期)に各尿中NAD代謝産物排泄量を2群間で比較したが、アルブミン尿の程度で定義した腎症合併の有無では、5つの尿中NAD代謝産物排泄量のいずれにおいても2群間で有意な差を認めなかった。

次に、5つの尿中NAD代謝産物排泄量と各臨床パラメーターとの相関関係を探索したところ、NAD⁺とNMNの尿中排泄量がeGFRと強い正相関関係を示した。また、NAD⁺はBMI

と負の相関を示す傾向になった。一方、いずれの尿中 NAD 代謝産物排泄量とも、年齢、HbA1c、尿中アルブミン排泄量と相関関係を認めなかった（図3）。

		NAD+	NADH	Nicotinamide	NMN	1-MNA
eGFR	相関係数	0.71	0.28	0.13	0.57	-0.45
	P値	0.003	0.31	0.66	0.028	0.26
年齢	相関係数	0.18	0.08	0.41	0.13	-0.26
	P値	0.53	0.78	0.13	0.46	0.53
HbA1c	相関係数	-0.1	-0.12	-0.11	-0.12	-0.47
	P値	0.73	0.68	0.69	0.68	0.24
BMI	相関係数	-0.48	-0.3	0.04	-0.27	0.17
	P値	0.07	0.27	0.88	0.33	0.69
ACR	相関係数	-0.6	-0.13	0.01	0.05	0.05
	P値	0.83	0.64	0.99	0.85	0.91

図3. 尿中 NAD 代謝産物排泄量との相関

以上の成績からは、尿中 NAD+排泄量が腎機能低下に伴い低下することが示された。このことは、腎臓内、特に尿細管における NAD+産生の低下が腎機能低下と関連している可能性が考えられ、糖尿病患者で NAD+産生が低下することで、NAD+を利用する代謝経路の障害を介し腎機能障害、尿細管障害を惹起させる可能性が推測され興味深い。現在、さらに測定サンプル数を増やし測定を継続しており、データの再現性を確認し、論文化を目指していく。さらに、各対象症例で経年的に保存されている経年尿検体を用いて尿中 NAD 代謝産物量を定量測定し、その経年的変化の推移を明らかとし、尿中 NAD+排泄量低下が腎機能低下の結果であるのか、それとも腎機能低下を予測できる指標となりえるのかをさらに検討していく予定である。また、経年的尿中 NAD 代謝産物量の変化推移を、個々の症例の臨床検査所見・薬物療法などの経年的推移と照らし合わせることで、NAD 代謝産物量に影響を及ぼす可能性のある病態や薬物療法などを探索していく予定である。

遺伝子関連研究：

NAD+代謝に関連すると考えられる INMT, NMMT 遺伝子において、INMT 遺伝子の 5 SNPs

と NMMT 遺伝子の 14 SNPs について遺伝子型を同定した。結果、INMT 遺伝子多型のアレル頻度、遺伝子型において腎症との関連は認められなかった。

一方、14 個の NMMT 遺伝子多型のうち、1 つの SNP (rs12224177) G/T 遺伝子多型の G アレル頻度が、腎症合併群で 1.0%に比して非合併群で 2.3%と統計学的有意にアレル頻度に差を認めた（オッズ比 0.41, 95%信頼区間 0.25-0.66, P=0.0002）。しかしながら、アレル頻度は非常に低頻度であった。

また、ハプロタイプ解析においても同様に、INMT 遺伝子内の 5 つの SNPs におけるハプロタイプ解析では、腎症との関連は認められなかったが、NMMT 遺伝子内の 2 つのブロック構造において、腎症との関連が示唆された（図4）。

遺伝子	ブロック構成 SNPs	ハプロタイプ	症例群頻度	対照群頻度	P値
INMT	rs6959671	TGTGC	0.62	0.63	0.39
	rs2075005	TGTAT	0.18	0.19	0.41
	rs2302339	CATAC	0.1	0.09	0.2
	rs2302340	CGCAC	0.09	0.08	0.32
	rs1061644	TGCAC	0.02	0.01	0.22
NMMT	ブロック1				
	rs4646335	TCGTT	0.46	0.48	0.12
	rs2256292	AGGCT	0.25	0.22	0.04
	rs2301128	AGACT	0.11	0.12	0.72
	rs1941404	ACGTT	0.1	0.1	0.86
	rs1894030	ACGCC	0.08	0.08	0.91
	ブロック2				
	rs2155806	TGC	0.92	0.92	0.94
	rs11214938	CAT	0.06	0.04	0.14
	rs17116804	CGC	0.026	0.035	0.07
	ブロック3				
	rs2604279	TG	0.84	0.83	0.27
	rs2852447	CA	0.106	0.124	0.04
		TA	0.05	0.04	0.24

図4. ハプロタイプ解析の結果

以上の結果、NMMT遺伝子多型が腎症の発症と関連する可能性が示唆された。しかしながら、腎症と関連を示したSNPならびにハプロタイプの頻度は非常に低頻度であり、臨床応用を考えた場合、有力な疾患感受性遺伝子として臨床応用することは難しいのではないかとと思われる。そこで今後、NAD+代謝関連分子の尿中排泄量に及ぼすこれら遺伝子多型・ハプロ

ロタイプの影響を検討し、これら遺伝子と腎症発症との関連に介在する因子・機構が存在している可能性を探るために、本研究課題の研究期間終了後においても、今後も継続してNAD⁺代謝関連分子の尿中排泄量の測定を実施し、NAD⁺代謝関連分子の尿中排泄量に及ぼす遺伝子多型の影響を検討していく予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

荒木 信一 (ARAKI SHIN-ICHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80378455