

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590930

研究課題名 (和文) 遠位尿細管による血圧調節機構に関する研究

研究課題名 (英文) Renal distal tubule and blood pressure regulation

研究代表者

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

研究成果の概要：

NMR を用いてギテルマン症候群や慢性腎疾患患者・透析患者の血液をメタボローム分析した。慢性腎疾患患者の各ステージについて NMR スペクトルを測定し、パターン認識法で解析の結果ステージ 5 については明確な判別が出来た。本法でステージ 1-4 についても代謝物パターンを抽出する可能性を示した。透析前後血漿の PCA 解析により代謝物変動を包括的に捉えた。予期せぬ変動としてラクテートを導いた。メタボロームプロファイリングの有効性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野:腎臓内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：メタボローム解析、ギテルマン症候群、CKD,

1. 研究開始当初の背景

腎遠位部尿細管サイアザイド感受性 NaCl 1 トランスポーター (NCCT) の先天性異常にて、脱水性疾患であるギテルマン症候群が発症する。低カリウム血症、低マグネシウム血症があり、また脱水のためレニン・アンジオテンシン系が亢進し血圧を維持している病態である。このモデル動物は NCCT 遺伝子ノックアウトマウスモデルとして作成されており、ヒト・ギテルマン症候群と類似していることが知られている。また、NCCT の機能を調節する因子は他に WNK キナーゼが最近知られ、この分子の腎電解質代謝や生体への影響が注目されている。しかし、これらの腎疾患患者のメタボローム異常については包括的な研究が実施されていない。その解析方法は十

分確立にはしていなかった。

2. 研究の目的

本研究では NaCl トランスポーターや WNK キナーゼが発現する遠位部尿細管機能に着目し、この部位での機能異常による生体への影響を解析したい。まず、NaCl トランスポーター異常であるギテルマン症候群に注目し、血圧調節機構や電解質代謝のみならず、生体全体へのメタボロームへの影響を解明したい。これを踏まえ、遠位部尿細管における生活習慣病 (血圧、代謝) への関与を解明する。そのため NMR を用いた腎疾患患者のメタボローム解析を包括的に実施し、異常病態の早期診断法を確立する。

3. 研究の方法

1) NMR (核磁気共鳴) メタボローム解析系を確立し、動物やヒトの生体材料 (尿、血液) を用いて代謝産物の一斉分析を試みに実施する。そのために、NMR 測定装置の整備、ソフトウェアの整備、周辺機器の整備をおこなう。次に、実際の標準材料を用いて、測定系の正確な解析条件を見出す。温度やNMRパルスなど特に血液サンプルに最適な測定プロトコルを確立する。

2) 生体試料において代謝産物を実際に一斉分析し、その代表的代謝産物の解析パターンを表示するソフトウェア (Alice2 for Metabolome) を用いて主成分分析 (PCA) を行い、いくつかのパターン分析を実施する。

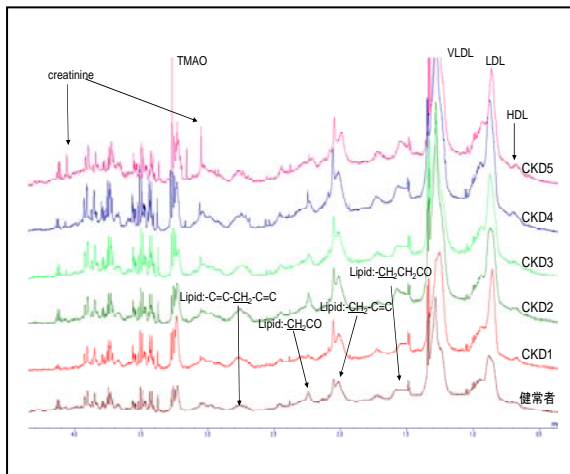
3) ギテルマン症候群患者の血液や尿を用いて、メタボローム解析を実施し、主成分分析にて代謝物のパターンを類型化する。

4) NMR を用いた包括的メタボローム解析を、腎疾患患者において実施する。

5) 透析患者血漿を用いて透析前後のメタボロームプロファイリングを求める。透析液での代謝物動態の違いなどを検討する。

4. 研究成果

1) NMRメタボロミクスのヒトサンプル解析実験系の基礎技術を検討した。偽雑物の多い尿・血漿の採取とNMR用サンプリング条件を確立した。高分子成分除去のための分子ふるいやCPMGパルスの検討を行い、後者の有効性を確認した。代謝物の定量について、標品添加実験を行い内部標準物質の検討をした。高分子成分の多い血液サンプルで低分子代謝物の定量を行うことは従来困難であったが、ギ酸などを内標とする方法は有望であることがわかった。

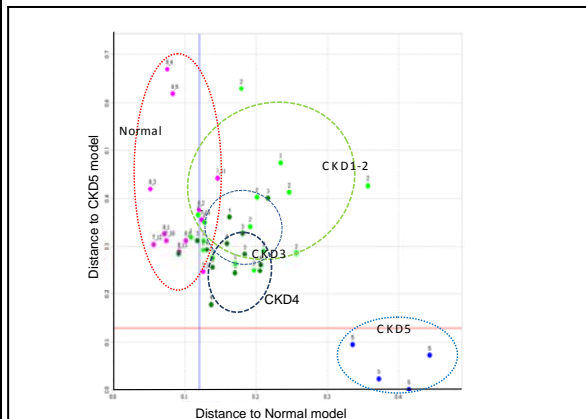


マーカーの濃度を定量することは病態解析を性格に行うために極めて重要であり本法の基礎を形成するものである。

2) CKDの各ステージの血漿サンプルマーカーの濃度を定量することは病態解析を性格に行うために極めて重要であり本法の基礎を形成するものである。を収集し¹H NMR測定をした。左下図

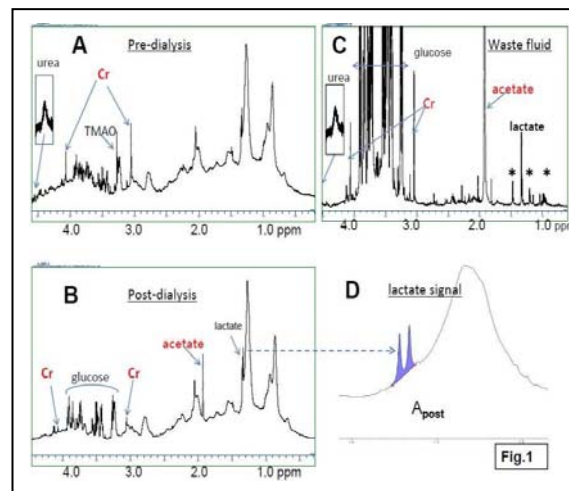
3) ギテルマン症候群患者を含むCKD患者血漿をNMR測定し、パターン認識法の1つであるSIMCA法 (Soft Independent Modelling of Class Analogy, 部分空間法) を用いた解析を行った。

4) その結果CKD5は他と明確に判別された。CKD1-4は必ずしも分類されないが、本方法で今後サンプル数を増やすとともに性年齢、あるいは原疾患などを揃えた解析が可能性のあることを示せた。

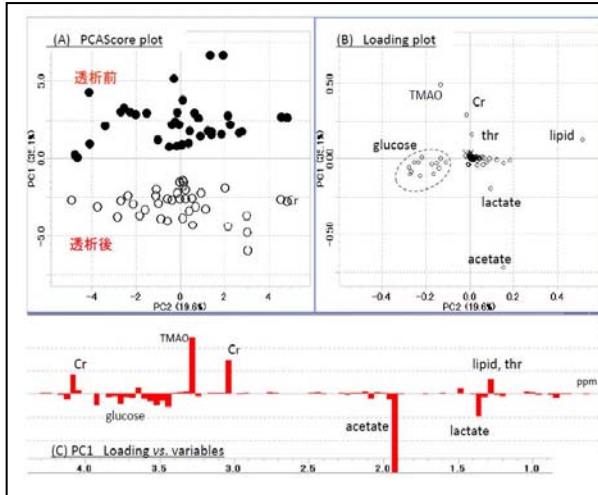


上図はSIMCAのCooman's plot

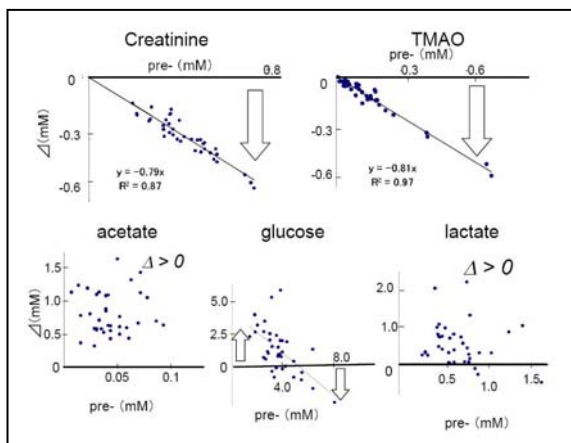
5) CKDの進行した病態である血液透析治療の前と後で患者血漿を、さらに透析廃液も採取し、プロトンNMR測定を行った。(下図)



透析患者のスペクトルを統計的パターン認識 (PCA) で解析した。前後のスペクトルパターンは明確に識別され、同時に代謝物の変動が包括的に把握することが出来た。クレアチニンの変動はもちろん、それ以外にトリメチルアミンNオキシド、グルコース、ラクテート、アセテートの変動が明らかになった (下図)



これらの NMR スペクトル上での定量を行った。クレアチニン、TMAO は透析前に蓄積した値の 80% が除去されたことが示された。アセテートは体内にわずかしかないが透析後には全員増加しており、グルコースは蓄積量に応じて負の相関を示した。ラクテートは元々血中に存在するが、透析後にほとんどの人が増加したことがわかった (増加量の平均と SD は 0.7 ± 0.6 mM)。



アセテートは透析液に含有することから透析後の血漿中の増加は説明される。グルコースも糖尿病性患者は血中量が多いなど、透析液と血漿との量のバランスで増減が決まると考えてよい。ラクテートについては透析で

除去され、減るはずの低分子である。使用した透析液にはラクテートは含有しないが、透析廃液のスペクトルを測定するとラクテートの信号が大きく検出されたことから、体外へ除去されることは確認している。低分子が 80% という同じ割合で除去されると考えれば、約 4 時間という透析治療の結果、ラクテートが血中に増加することは除去分を補ってなお増やすだけの供給が体内からあると考えざるを得ない。予期せぬ変動として浮かび上がったラクテートは病態変動を捉える有益な指標となるのではないかと。

以上、代表的腎疾患患者として透析患者の血液を用いて、透析前後のメタボローム変化を検出した。論文として投稿し、受理された。

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 1 件, 査読有り)

(1) Masako Fujiwara, Takeshi Kobayashi, Takahiro Jomori, Yutaka Maruyama, Yoshitomo Oka, Hiroshi Sekino, Yutaka Imai, Kazuhisa Takeuchi. Pattern recognition analysis for ^1H NMR spectra of plasma from hemodialysis patients. *Anal. Biolanal. Chem.* 2009 (in Press)

〔学会発表〕 (計 21 件)

- (1) 藤原正子、小林武志、城守隆宏、丸山穰、安藤一郎、根本直、今井潤、竹内和久 「 ^1H NMR Metabolic Profiling of Blood Plasma from Patients with Chronic Kidney Disease」 第 8 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会 2009. 1. 29 つくば
- (2) 竹内和久 「アセテート・フリー透析液 (カーボスター) を用いた透析病態の NMR メタボローム解析」 宮城腎不全研究会 2008. 12. 7 仙台
- (3) 藤原正子、小林武志、城守隆宏、丸山穰、竹内和久、今井潤 「 ^1H -NMR メタボロミクスの医療応用 - CKD (慢性腎臓病) 血漿の解析」 第 14 回 NMR 学会 討論会 2008. 11. 14 つくば
- (4) 藤原正子 「NMR を用いたメタボロミクスの医療応用 - 代謝異常、生活習慣病などを標的として」 第 13 回 東北大 ライフサイエンスシンポジウム 2008. 11. 7
- (5) 小林武志、城守隆弘、藤原正子、丸山穰、今井潤、竹内和久 「 ^1H -NMR メタボリック・プロファイリングを用いたヒト血漿の解析と代謝物定量」 第 3 回 メタボロームシンポジウム 2008. 10. 31 鶴岡

- (6) 藤原正子「NMRメタボリックプロファイリングを用いた透析患者血漿の解析」第3回メタボロームシンポジウム2008.10.31 鶴岡
- (7) Masaki Fujiwara, Takeshi Kobayashi, Takahiro Jomori, Itiro Ando, Yutaka Maruyama, Tadashi Nemoto, Yutaka Imai, Kazuhisa Takeuchi 「Statistical Pattern Recognition Analysis for NMR Spectra of Blood Plasma from Patients with Chronic Kidney Disease」 International Conference of Chem-Bio-Informatics, 2008. 10.24 東京
- (8) 竹内和久、小林武志、城守隆宏、藤原正子、丸山穰、今井潤「腎臓病の新しい病態解明法としてのNMRメタボローム解析」日本高血圧学会 2008.10.10 札幌
- (9) 丸山穰、藤原正子、小林武志、城守隆宏、竹内和久「CKDの新しい病態解明法としてのNMRメタボローム解析」分子腎臓研究会 2008.9.6 東京
- (10) 藤原正子「新たな国民病CKD(慢性腎臓病)をNMR-メタボリック・プロファイリングで測る」分析展シンポジウム 2008.9.4 幕張
- (11) 小林武志、城守隆宏、藤原正子、丸山穰、竹内和久「水素核NMR法を用いたCKD・人工透析患者血漿の解析」東北腎不全研究会 2008.8.24 山形
- (12) 城守隆宏、小林武志、藤原正子、丸山穰、竹内和久「水素核NMRを用いたヒト(健常・病態)血漿の解析」東北腎不全研究会 2008.8.24 山形
- (13) 戸恒和人、廣瀬卓男、中繁由紀子、浅山敬、丸山穰、藤原正子、竹内和久、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤。「CKDにおけるAM2 遺伝子多型の関与」第53回(社)日本透析医学会学術集会・総会。2008.6.20. 神戸
- (14) 竹内和久「¹H-NMRメタボローム解析による透析病態の解明」日本透析医学学術集会・総会 2008.6.20 神戸
- (15) 竹内和久「プロトンNMRメタボローム解析系の確立とその応用」日本腎臓学会 2008.6.3 福岡
- (16) 小林武志、城守隆宏、藤原正子、丸山穰、竹内和久、今井潤「¹H-NMRによるメタボリック・プロファイリング(2)-CKD・人工透析患者血漿のスペクトルパターン認識による解析-」東北大学バイオサイエンスシンポジウム 2008.5.20 仙台
- (17) 城守隆宏、小林武志、藤原正子、丸山穰、目時弘仁、竹内和久、今井潤「¹H-NMRによるメタボリック・プロファイリング(1)-ヒト(健常・病態)の尿および血漿のスペクトル解析-」東北大学バイオ

サイエンスシンポジウム 2008.5.20 仙台

- (18) 藤原正子、丸山穰、竹内和久、小林武志、今井潤。「NMRメタボロミクスの臨床応用-透析患者血漿の解析」日本農芸化学会年会 2008.3.26 名古屋
- (19) 藤原正子、丸山穰、竹内和久、小林武志、今井潤。「NMRメタボロミクスの医療への応用-生活習慣病・慢性腎疾患を標的にして」第2回メタボロームシンポジウム、2007.11.5. 東京
- (20) 竹内和久「生活習慣病を標的としたメタボロミクス研究の展開」分析展シンポジウム、2007.8.29. 幕張
- (21) 藤原正子、安藤一郎、有福和紀、金沢健治、根本直「メタボリック・プロファイリング法の新技術-Two step PCA法の糖尿病モデルへの応用-」JHUP0日本ヒトプロテオーム学会 2007.7.30, 東京

〔図書〕(計1件)

- (1) 藤原正子、今井潤、関野宏、竹内和久「NMRメタボロミクスの医療への応用-生活習慣病・慢性腎臓病を標的にして-」分担執筆、遺伝子医学 M00K16号:メタボロミクスと最新分子バイオマーカー研究-その探索技術と臨床・創薬応用研究の最前線 2009.8. 発刊予定

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

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・客員教授
研究者番号: 40260426

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

藤原 正子 (FUJIWARA MASAKO)
東北大学・大学院薬学研究科・客員准教授
研究者番号: 10466534