

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08702

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病の新規バイオマーカーとしての尿中NAD代謝関連分子の検証

研究課題名(英文) Urinary NAD metabolism-related molecules as novel biomarkers of diabetic kidney disease

研究代表者

荒木 信一 (Araki, Shin-ichi)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80378455

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)：糖尿病患者の予後改善を目指すためには、腎症を含む血管合併症の発症リスクの高い症例を早期に同定し、適切な個別化医療を実施することが重要となる。本研究課題では、NAD代謝産物の尿中排泄量が、糖尿病性腎臓病の病態ならびに血管合併症発症の予測因子となりえるかを検討した。200名の日本人糖尿病患者を対象に、2003-2004年に採取し長期保存している尿検体を用いて、NAD、NADH、1-MNAの3代謝産物濃度をHPLC-MS/MS法により測定した。現在、観察開始時の臨床データとの関連、ならびに中央値16年の観察期間で発症した腎・心血管イベントとの関連について検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、透析患者の原疾患の第一位が糖尿病性腎臓病で約40%を占めている。また、糖尿病性腎臓病の重症化に伴い心血管イベントの発症リスクが高まっていく。微量アルブミン尿が糖尿病性腎臓病の早期指標として広く臨床の現場で用いられているが、アルブミン尿だけでは重症化指標として十分ではないことが明らかで、新たなバイオマーカーが望まれている。現在、本研究課題で測定したNAD、NADH、1-MNAの3代謝産物と臨床検査データならびに経過観察研究で得られている腎・心血管疾患発症との関連を検討しているが、尿中NAD代謝産物の排泄量が病態や予後と関連することが明らかになれば、今後の個別医療に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：To improve the prognosis in patients with type 2 diabetes, it is important to identify patients at high risk of developing vascular complications, including diabetic kidney disease, at an early stage and to provide appropriate personalized medical care. In this study, we investigated whether urinary excretion of NAD metabolites is a predictive factor for the development and progression of vascular complications. Using the urine samples of 200 Japanese patients with type 2 diabetes mellitus which were collected in 2003-2004 and stored for a long time, we measured the concentrations of the three metabolites, NAD, NADH, and 1-MNA, by HPLC-MS/MS. At present, we are investigating the relationship with clinical data, as well as with renal and cardiovascular events that occurred during the median 16-year observation period.

研究分野：糖尿病性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 糖尿病性血管合併症 尿中NAD代謝産物

## 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・改善させていくためには、血管合併症の発症・進展を阻止することが重要となる。特に、糖尿病性腎臓病は、透析療法導入患者の主要原疾患であるだけでなく、心血管疾患発症の独立したリスクである。そのため、糖尿病性腎臓病の発症・進行を抑制することは、糖尿病患者の予後改善のために重要であるとともに、医療経済の観点からも重要な医療課題と言える。現在、糖尿病性腎臓病は、微量アルブミン尿の出現により早期腎症と診断される。この微量アルブミン尿の出現は、その後の腎機能低下のリスク因子であるとともに、心血管疾患発症の独立したリスクである。そのため、アルブミン尿の増加を抑制し、減少させることが重要な治療標的であった。これまでに、研究代表者らは、日本人2型糖尿病患者で微量アルブミン尿が高頻度で寛解すること (Araki S, Diabetes 2005)、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報告してきた (Araki S, Diabetes 2007)。

近年、新たな糖尿病治療薬の登場や、レニン・アンジオテンシン系(RAS)阻害薬を含むリスク因子の包括的集約治療により、糖尿病治療成績が向上してきており、糖尿病性腎臓病の発症・進展過程も非常に流動的で多様性に富んできている。特に、従来の糖尿病性腎症の発症進行過程とは異なり、アルブミン尿を合併する患者数が減少してきている一方、アルブミン尿の増加を伴わず腎機能が低下している症例が増加していることが新たな課題として明白となっている。そこで、アルブミン尿のみでは予測し得ない腎機能低下のリスクを判別できる新規バイオマーカー、あるいはアルブミン尿あるいはその他のバイオマーカーと組み合わせることで予後の予測能が向上する新規バイオマーカーの開発が望まれてきた。

これまでの基礎研究から、細胞内 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD<sup>+</sup>)の代謝異常、特に NAD<sup>+</sup>濃度の低下が加齢に伴う疾患や代謝異常に関連する疾患と関連することが報告されてきている。研究代表者らも、NAD<sup>+</sup>代謝経路の異常が腎症の発症・進展に影響を及ぼす可能性を検討し、その分子基盤として、NAD<sup>+</sup>により活性が制御されている NAD<sup>+</sup>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, J Clin Invest 2010, Kume S, Diabetes 2012)。さらに、脂肪酸結合蛋白負荷による尿管間質障害惹起マウスを用いて、腎臓内での遺伝子発現変化を網羅的に探索した結果、NAD<sup>+</sup>代謝に関連する Nicotinamide N-methyltransferase(NNMT)遺伝子発現が腎臓内で変化していることを報告してきた(Tanaka Y, Free Radic Biol Med 2015)。これらの基礎研究の結果より、研究代表者らは、糖尿病状態において NAD<sup>+</sup>代謝経路異常が糖尿病性腎臓病の発症と関連し、NAD<sup>+</sup>代謝関連分子の尿中排泄量が、腎症の新規バイオマーカーとなる可能性について研究を行ってきた。これまでに、少数例による断面研究の成績ではあるが、尿中 NAD<sup>+</sup>排泄量と尿中 MNN 排泄量が eGFR と正相関することを見出している(平成 29 年度成果報告書 荒木信一)。

しかしながら、今後の臨床応用を目指すためには、これら NAD<sup>+</sup>代謝関連分子の尿中排泄量と腎機能との関連が単に腎機能低下の結果に過ぎないのか、それとも細胞障害を反映し腎機能低下を予測しうる新規バイオマーカーとなりえるのか、さらに、何らかの治療介入(RAS 阻害薬など)により尿中排泄量が増加するのか、もし増加するのであればその後の腎機能の変化と関連するのか、あるいは、アルブミン尿あるいは既報の尿管間質障害バイオマーカーと組み合わせることにより鋭敏に腎予後を予測できるのかなど多くの未解決な問題があった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題は、これまでの先行研究の成績を更に継続・発展させ、NAD<sup>+</sup>代謝関連分子の尿中排泄量あるいは腎クリアランスが、日本人2型糖尿病患者の腎機能低下を予測する新規バイオマーカーとしての臨床応用に向けた検証を行うことを目的とする。

既に研究代表者らは、1996 年より2型糖尿病患者を対象とした滋賀糖尿病血管合併症前向き経過観察研究を実施し、経年的に糖尿病関連検査データ、尿・DNA サンプルの蓄積と予後調査をおこない、糖尿病血管合併症のバイオマーカーの探索研究を行ってきた。そのため、本研究課題では、前向き経過観察研究で蓄積されている臨床データ、血清・尿サンプルを用いて、NAD<sup>+</sup>代謝関連分子の尿中排泄量の新規バイオマーカーとしての可能性を、特にその尿中排泄量の変動に着目して検証すること、さらに、これまで研究代表者が報告してきたバイオマーカーと組み合わせることで予測能が向上する可能性を探索することを学術的特徴とする。

本研究課題は、これまでの我々の研究室での基礎・臨床研究より得られた知見に基づき、糖尿病性腎臓病(DKD)の新規バイオマーカーとして尿中 NAD<sup>+</sup>代謝関連分子の臨床応用を目指している点が学術的特色である。この着眼点は、我々独自のものであり、これまでにヒトを対象とした NAD<sup>+</sup>代謝関連分子と糖尿病血管合併症との関連について国内外で同様の報告はなされていない。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象患者

研究代表者は、1996 年から滋賀医科大学倫理審査委員会の承認と患者同意のもと実施してい

る滋賀糖尿病血管合併症前向き経過観察研究の中心研究者として臨床研究を主導し、腎症其自然史に関する研究、腎症感受性候補遺伝子研究、腎症早期診断のための新たなバイオマーカー探索研究を行ってきた。この経過観察研究では、経年的に身体所見、糖尿病関連臨床検査データ、血管合併症関連検査データ、投薬内容、合併症発症の有無、予後などのデータが蓄積されデータベース化されている。さらに、DNA、血清、尿サンプルが同様に経年的に収集され長期保存されている。そこで、滋賀医科大学倫理委員会の承認のもと、2003年 - 2004年この滋賀糖尿病血管合併症前向き経過観察研究に登録され、臨床データ、尿検体が長期保存されている日本人2型糖尿病患者200名を対象とした。

#### 2) 尿中 NAD<sup>+</sup>代謝産物の測定

観察開始時に24時間畜尿から採取され、-80度で長期保存されている尿検体を用いて、HPLC-MS/MS法により尿中NAD代謝産物を測定した。測定には、シミックファーマサイエンス株式会社と業務委託契約を締結し実施した。測定装置は、Nexera UHPLCシステム(SHIMADZU)、Triple Quad 5500 (SCIEX)を用いた。

当初、尿中NAD代謝産物として、NAD、NADH、NMN、Nicotinamide、1-MNA (1-Methylnicotinamide)を計画していたが、研究予算の関係上、NAD、NADH、1-MNAの3代謝産物を優先的に測定することとした。尿中NAD代謝産物の尿中排泄量は、24時間畜尿による尿検体を用いて上記の方法により尿中NAD代謝産物の濃度を測定し、1日尿中排泄量として算出した。

#### 3) 腎・心血管イベント発症

本研究課題で尿中NAD<sup>+</sup>代謝産物を測定した200症例を2020年までの腎・心血管イベントの発症を調査した。主要評価項目は、慢性維持透析(血液・腹膜)の導入、心筋梗塞・狭心症・慢性閉塞性動脈硬化症(血行再建術の施行)の発症、総卒中(脳梗塞・脳出血)の発症からなる複合エンドポイントで、どれか一つのイベント発症までを観察期間とした。

#### 4) 統計解析

データは平均値±標準偏差(非正規分布の場合:中央値(4分位))で表示した。2群間の平均値の比較はStudent t検定(非正規分布の場合:Mann-Whitney U検定)、3群以上の比較にはTukey-Kramer test(非正規分布の場合:the Kruskal-Wallis)にて実施した。カテゴリ変数については<sup>2</sup>検定を実施した。2群間の相関係数はSpearmanの順位相関係数を用いて検定を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 対象患者の臨床像

本研究課題で測定した日本人2型糖尿病患者200名の尿検体採取時の2003-2004年滋賀糖尿病血管合併症前向き経過観察研究登録時の臨床像を表1に示す。

表1 尿検体採取時(2003-2004)の対象患者背景

n	200
Age (year)	61.6 ± 9.5
Gender (male, %)	63
Known duration of diabetes (year)	14 (9 to 22)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.3 ± 3.6
HbA1c (%)	7.6 ± 0.9
Diet/oral agents/insulin (%)	7/59/34
Systolic BP (mmHg)	135 ± 16
Hypertension (%)	48%
RAS inhibitors (%)	36%
LDL-C (mg/dL)	125 ± 24
Ccr (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	110 ± 34
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	76.7 ± 22.0
Urinary albumin excretion rate (μg/min)	10.7 (5.0 to 43.0)
Albuminuria stage (normo/micro/macro, %)	64.5/26.5/9.0
Retinopathy (%)	50
1-MNA (μmol/日)	55.9 (38.3 to 83.7)
NAD (nmol/日)	16.8 (9.1 to 34.5)
NADH (nmol/日)	8.4 (6.9 to 10.3)
NAD/NADH 比	2.0 (1.2 to 3.7)

尿中NAD代謝産物の1日尿中排泄量に影響を与える可能性のある因子を検索していくため層別解析を行った。まず、男女別に比較した場合、1-MNA(男性:女性 80.5 (51.4 to 114.1): 48.2 (32.6 to 61.3), P<0.001)とNADH(男性:女性 10.0 (7.6 to 13.1): 8.1 (6.3 to 9.5), P<0.001)は、男性が女性よりも有意に高値であり、その一方で、NAD(男性:女性 14.0 (7.3 to 19.7): 34.1 (24.2 to 45.2), P<0.001)とNAD/NADH比(男性:女性 1.4 (0.8 to 1.9): 4.2 (3.1 to 6.3), P<0.001)は、男性が女性よりも有意に低値であった。

また、観察開始時に RAS 阻害薬の服薬の有無別に比較した場合、1-MNA のみが有意に RAS 阻害薬の服薬で低値であり、その他の NAD, NADH, NAD/NADH 比には群間差は認められなかった。さらに、アルブミン尿のステージ別において、尿中 NAD 代謝産物に群間差は認められなかった。

## 2) 尿中 NAD 代謝産物排泄量と観察開始時の臨床データとの相関

各尿中 NAD 代謝産物の 1 日尿中排泄量と相関関係を示す主要な臨床検査データを表 2 に示す。

表 2 相関関係 (Spearman の順位相関係数)

		age	Cre	蛋白摂取量(g/kg)	塩分摂取量(g)	尿中 Cr 排泄量(g)
1-MNA	相関係数	-0.26	0.05	0.38	0.38	0.50
	P 値	<0.001	0.49	<0.001	<0.001	<0.001
NAD	相関係数	0.04	-0.44	0.14	-0.07	-0.24
	P 値	0.57	<0.001	0.04	0.35	<0.001
NADH	相関係数	-0.22	0.15	0.25	0.17	0.52
	P 値	0.001	0.03	<0.001	0.02	<0.001
NAD/ NADH 比	相関係数	0.12	-0.44	-0.01	-0.17	-0.45
	P 値	0.10	<0.001	0.93	0.02	<0.001

表 2 のごとく、各尿中 NAD 代謝産物と相関関係を示す臨床データがいくつか示された。現在、より詳細な解析を行っており、その臨床的意義などを検討していく予定である。

## 3) 腎・心血管イベント発症

今回、尿中 NAD 代謝産物排泄量を測定した 200 症例は、滋賀糖尿病血管合併症前向き経過観察研究に参加されており、観察開始後より 2020 年まで観察期間中央値 16 年 (11 to 17) の前向き観察を行い、その後のイベント発症などについて記録・保存されている。その観察期間中、200 症例のうち 67 症例で主要評価項目のイベントを発症した。今後、このフォローアップデータを用いて、観察開始時の尿中 NAD 代謝産物の 1 日尿中排泄量が、腎・心血管イベントの発症予測の新規マーカーとなりえるか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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木信一
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病（DKD）進行抑制のための包括的戦略
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木信一
2. 発表標題 DKDの最近のトレンド
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------