

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460207

研究課題名(和文)腎不全に合併する高ホモシステイン血症が心血管疾患発症・進展に関わる機序の解明

研究課題名(英文)Effect of hyperhomocysteinemia on vascular dysfunction in renal failure

研究代表者

長谷川 弘 (HASEGAWA, HIROSHI)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80218453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全は、それ自身が心血管疾患の危険因子であるが、心血管疾患の危険因子である高ホモシステイン血症を合併する。腎不全に伴う高ホモシステイン血症の成因機構を明らかにすること、腎不全に合併する心血管疾患に高ホモシステイン血症がどのように関与するかを明らかにすることを目的に、5/6腎摘除ラットを腎不全モデルとして用い、代謝フラックス解析及び薬理学的解析を行った。その結果、腎不全ではホモシステインからメチオニンへの再メチル化能が低下していることが高ホモシステイン血症の成因の一つであることが明らかになった。また、腎不全に高ホモシステイン血症が合併すると、血管平滑筋に及ぶ障害が惹起されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) and hyperhomocysteinemia are risk factors of cardiovascular disease individually. While the association of CKD and hyperhomocysteinemia is well established in clinical populations, little is known about the role of hyperhomocysteinemia in the development of vascular dysfunction of CKD. This study is conducted to clarify how plasma homocysteine (Hcy) is elevated in CKD and the effects of hyperhomocysteinemia on vascular function in CKD. We determined the turn over rates for Hcy production and disposal of 5/6 nephrectomized rats using a stable isotope technique and showed that decreased remethylation of Hcy to methionine (Met) was associated with hyperhomocysteinemia in CKD. Using 5/6 nephrectomized rats with hyperhomocysteinemia induced by Met-enriched diets, vasodilations of thoracic aorta were determined. Combination of hyperhomocysteinemia and CKD resulted in impairments of both endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilations.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ホモシステイン メチオニン 腎不全 代謝フラックス GC-MS 安定同位体 血管内皮 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

腎不全は心血管疾患の合併頻度の高い病態である。メチオニンの代謝物であるホモシステインの血漿中濃度が基準値より高く維持された状態（高ホモシステイン血症）は、心血管疾患の危険因子の一つである。腎機能低下に伴って、ホモシステインの血漿中濃度も上昇する。したがって、腎不全に高ホモシステイン血症が合併すると、相加的あるいは相乗的に心血管疾患の発症・進展に関与していると考えられる。しかし、腎機能低下に伴って、何故ホモシステインの血漿中濃度が上昇するのか、腎不全に合併する心血管疾患に高ホモシステイン血症がどのような機序で関わっているのかは全く不明である。

2. 研究の目的

腎不全に伴う高ホモシステイン血症の成因機構を明らかにすること、腎不全と高ホモシステイン血症が合併したときに、血管系に与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、(1)代謝フラックス解析と(2)血管作働薬に対する応答性の薬理的解析からなる。

(1) 代謝フラックス解析

本研究のストラテジーは以下の通りである。

安定同位体標識体をトレーサーとして一定の投与速度で持続静脈内投与したとき、トレーサーは内因性成分により希釈され、やがて標識体と非標識体の総和に占める標識体の割合、すなわち enrichment は一定となる。定常状態では、代謝プールにおける流入速度と流出速度が等しく、この代謝回転速度は、トレーサーの投与速度と enrichment 値から算出できる。メチオニン-ホモシステイン-シスタチオニン代謝系は組織（細胞）内で起きる反応であるのに対して、観測点は血漿中である。そこで、血漿中の enrichment をもとに組織中の enrichment を求める新しい方法を考案した。

トレーサーとして投与する標識体には、メチオニンの 3、4 位及び S-メチル基に重水素を導入した [3,3,4,4-S-メチル- $^2\text{H}_7$]メチオニン ($^2\text{H}_7$ メチオニン)及び [3,3,4,4- $^2\text{H}_4$]ホモシステイン ($^2\text{H}_4$ ホモシステイン)を用いる。 $^2\text{H}_7$ メチオニンを投与すると、生体内で脱メチル化されて $^2\text{H}_4$ ホモシステインが、さらにこれが再メチル化されると [3,3,4,4- $^2\text{H}_4$]メチオニン ($^2\text{H}_4$ メチオニン)が生成する。 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニンと内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステインと内因性ホモシステインは、質量数が異なるため、それぞれガスクロマトグラフ-質量分析計-選択イオン分析法 (GC-MS-SIM) で区別して測定することができる。

$^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及びホモシステインの血漿中濃度より算出した $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインの Enrichment (それぞれ E_{M7} 、 E_{M4} 、 E_{H4}) がそれぞれプラトーに達したときの値を用いて、脱メチル化代謝回転速度 (DM)、再メチル化代謝回転速度経路 (RM) 及びイオウ転移代謝回転速度 (TS) を得る。さらに、DM を投与前の内因性 Met の血漿中濃度で除することで脱メチル化クリアランス (CL_{DM}) を、RM 及び TS を投与前の内因性 Hcy の血漿中濃度で除することで、それぞれ再メチル化クリアランス (CL_{RM}) 及びイオウ転移クリアランス (CL_{TS}) をそれぞれ算出する。

本研究は、慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘除 (Nx) ラット及び偽手術 (Sham) ラットに対して、 $^2\text{H}_7$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステイン投与による代謝フラックス解析を施行した。

Nx ラットの作出

6 週令ラットの左腎 2/3 を摘除した。1 週後に右腎を全摘除した。術後 2 週あるいは 5 週飼育したラットを実験に供した。腎摘除量は体重をもとに求め、およそ 70% 腎摘除モデルを作出した。

持続静脈内投与

Nx ラット及び Sham ラットに、 $^2\text{H}_7$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインをそれぞれ個別に急速静脈内投与 + 持続静脈内投与した。このとき、投与する $^2\text{H}_7$ メチオニンや $^2\text{H}_4$ ホモシステインによって内因性メチオニン及びホモシステインの代謝プールが変動することを極力抑えるため、投与した $^2\text{H}_7$ メチオニンや $^2\text{H}_4$ ホモシステインの血漿中濃度が内因性メチオニン及びホモシステインの約 1/10 になるように投与量及び投与速度を設定した。予備検討として、Nx ラット及び Sham ラットに、 $^2\text{H}_7$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインをそれぞれ個別に単回急速静脈内投与を行い、その血漿中濃度推移から $^2\text{H}_7$ メチオニン及び $^2\text{H}_4$ ホモシステインの消失速度を求め、投与速度設定に用いた。

試料調製及び GC-MS-SIM による測定

経時採血して得た血漿に、既知量の ^{13}C メチオニン及び ^{13}C ホモシステインを内標準物質として添加後、ジチオトレイトールによる還元、トリクロロ酢酸による除タンパク、陽イオン交換樹脂による精製、及び水-エタノール-ピリジン溶液中クロロギ酸イソブチルによる誘導化を行い、得られた N(0,S)-イソブチルオキシカルボニル エチルエステル誘導体を GC-MS-SIM で測定した。 $^2\text{H}_7$ メチオニン、 $^2\text{H}_4$ メチオニン、内因性メチオニン、 $^2\text{H}_4$ ホモシステイン及び内因性ホモシステインの血漿中濃度から、 E_{M7} 、 E_{M4} 及び E_{H4} を算出した。採血時間に対して E_{M7} 、 E_{M4} 及び E_{H4} をそれぞれプロットしたグラフから、 E_{M7} 、 E_{M4} 及び E_{H4} が一定になった値を求め、DM、RM 及び TS を算出した。さらに、 CL_{DM} 、 CL_{RM} 及び CL_{TS}

を算出した。

(2) 血管作働薬に対する応答性の薬理的解析

Nx ラット及び Sham ラットをそれぞれ 2 群にわけ、術後 1 週目より 2% Met 強化食 (Met) あるいは基礎食 (Ctl) で飼育した (計 4 群: Nx-Met; Nx-Ctl; Sham-Met; Sham-Ctl)。経過的に、tail-cuff 法により血圧を測定した。特殊食での飼育開始後 5 週目に、全血採血後、胸部大動脈を摘出し、マグヌス法を用いて、血管に作用する薬物に対する反応性を観察した。

4. 研究成果

(1) 代謝フラックス解析

全腎の約 70% を摘除した Nx ラットの血漿クレアチニン (2 週、 0.66 ± 0.13 mg/dL; 5 週、 0.82 ± 0.23 mg/dL) は、Sham ラット (0.33 ± 0.04 mg/dL) に比べて有意に高く、また、術後の飼育期間が長くなるに従い高値になった。一方、Nx ラットの血漿ホモシステインは、術後 2 週目 (9.83 ± 1.74 μ M) では Sham ラット (5.60 ± 0.43 μ M) に比べて有意に高くなったものの、術後 5 週 (7.65 ± 2.29 μ M) では、Sham ラットに比べてわずかに高値であった。術後の週令を重ねることにより、血漿ホモシステインが上昇するものと期待したが、目標とした 15 μ M 以上の高ホモシステイン血症を合併したモデルの作出はできなかった。

これらのラットにそれぞれ個別に [2 H₇]メチオニン及び [3 H₄]ホモシステインを急速+持続静脈内投与した。

まず、Hcy の生成系、すなわち、Met の脱メチル化反応が 5/6 腎摘除によってどのように変動しているかを検討した。 [3 H₄]Hcy 投与の結果から求めた術後 5 週の Nx ラットの CL_{DM} (3.29 ± 0.38 L/hr/kg) は、Sham ラット (3.31 ± 0.65 L/hr/kg) 及び術後 2 週の Nx ラット (3.14 ± 0.76 L/hr/kg) とほぼ同じであった。S-アデノシルメチオニン (SAM) を基質とするメチル化反応は生体のメチル化反応のほとんどを担っている反応であるが、SAM を合成する酵素 (MAT) は肝臓で強く発現していること、SAM を基質とするメチル基転移酵素は様々な臓器に広く分布していること、S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼは様々な臓器に局在するが、肝臓での活性が強いことが知られている。このように、脱メチル化経路に関わる酵素の発現や活性が肝臓に高いことから、5/6 腎摘除による影響を受けず、DM に差違が認められなかったと考えられた。

Hcy の消失系、すなわち、Hcy の再メチル化反応とイオウ転移反応が 5/6 腎摘除によってどのように変動するかを検討した。術後 5 週の Nx ラットの CL_{re} (3.48 ± 0.86 L/hr/kg) は、Sham ラット (6.62 ± 2.01 L/hr/kg) のおよそ 1/2 で、術後 2 週の Nx ラット (4.20

± 1.16 L/hr/kg) とほぼ同じであった。再メチル化反応に關与する酵素であるメチオニンシンターゼ (MS) とベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (BHMT) のうち、BHMT はヒトでは肝臓、腎臓に分布しているが、ラットでは肝臓に局在化している。一方、MS はヒトおよびラットにおいて様々な臓器に分布しているが、ラットでは腎臓に最も高い活性がある。このことから、5/6 腎摘除による MS の減少によって、Hcy の再メチル化能が低下したことが示唆された。

術後 2 週の Nx ラットの CL_{TS} (13.0 ± 3.5 L/hr/kg) は Sham ラット (23.2 ± 8.7 L/hr/kg) に比べて大きく低下したが、術後 5 週の Nx ラット (20.1 ± 4.7 L/hr/kg) では Sham ラットに近い値までもどった。このことから、手術後の飼育期間を長くしたことで、肝臓、腎臓、膵臓に分布するシスタチオニン β -シンターゼ (CBS) 及びシスタチオニン γ -リアーゼ (CGL) の発現が変化し、腎実質の減少に伴う CBS 及び CGL の喪失分を補ったことが示唆された。

本研究により、腎実質の減少に伴って、再メチル化経路が阻害されることが、ホモシステインの血漿中濃度上昇の一因であることが明らかになった。しかし、5/6 腎摘除によって腎不全モデルを得ることはできたが、飼育期間によらず高ホモシステイン血症を合併したモデルとはならなかった。腎摘除量を増やすなど、高ホモシステイン血症合併腎不全モデルの作出法を確立することが今後の課題である。

(2) 血管作働薬に対する応答性の薬理的解析

(1) の結果より、5/6 腎摘除するだけでは高ホモシステイン血症を作出できないことが明らかになった。高ホモシステイン血症モデル作出法として、食餌に Met を混餌する方法、ホモシステチンを混餌する方法がある。Met 混餌の場合、高ホモシステイン血症とともに高メチオニン血症にもなる。ホモシステチン混餌の場合、L-ホモシステチンを用いるのが望ましいが、非常に高価であるため、一般には DL-ホモシステチンが用いられている。しかし、D-ホモシステチンは非天然型アミノ酸であり、L-Hcy を代謝する酵素である MS、BHMT、CBS の基質とはならない一方で、アルブミンなどの血漿タンパクとは L-Hcy 同様に、非酵素的にジスルフィド結合する。そのため、D-Hcy (D-ホモシステチン) は L-Hcy (L-ホモシステチン) とは異なった生体内挙動をとる可能性があるが、D-Hcy (D-ホモシステチン) の生体内挙動は全く不明である。そこで、本研究では、Met を混餌ことにした。

Nx ラット及び Sham ラットを 2% Met 強化食で飼育した。経過的に血圧測定した結果、特殊食摂取開始後 5 週で、Nx-Met 群の収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) とともに、Sham-Ctl 群より有意に高値を示した。また、その時点

でのHcyの血漿中濃度は、コントロール食を摂取した2群(Sham-Ctl $7.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 、Nx-Ctl $6.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$)に比べて、Met強化食の2群(Sham-Met $39.9 \pm 27.4 \mu\text{M}$ 、Nx-Ctl $43.7 \pm 15.4 \mu\text{M}$)は有意に高値であった。また、その値は、末期腎不全患者で認められる高ホモシステイン血症の血漿Hcy(約 $30 \mu\text{M}$)とほぼ同じであったことから、Met強化食で飼育することで、目標とした末期腎不全に近い状態の高ホモシステイン血症モデルを作出できたと判断した。

胸部大動脈を用いて、血管作働薬による血管収縮、弛緩反応性を測定した。その結果、Nx群はSham群に比べてノルエピネフリンにより強く収縮した。また、Nx群はSham群に比べてアセチルコリンによる弛緩性が低下した。このことから、5/6腎切除によって、内皮依存的な血管弛緩性が低下していることが明らかになった。Nx-Met群はSham群に比べて有意に、またNx-Ctl群に比べてニトロプルシドナトリウムによる血管弛緩性が低下している結果を得た。このことから、腎不全に高ホモシステイン血症が合併した状態が持続すると、血管平滑筋に及ぶ血管障害を起こすことが示唆された。

本研究では、Met強化食摂取開始後5週にて実験を行った。しかし、この時点で、SBP、DBPともに上昇し始めたことから、飼育期間をより長くすると血管障害がより強く惹起する可能性があった。また、Nx-Met群では、血管平滑筋の障害を示唆する知見が得られたことから、イソプレナリンなど直接、血管平滑筋に作用する薬物を用いた検討も必要と考えられた。これらのことから、Met強化食による飼育期間を延長し、再測定することが望ましいと判断した。

以上のように、腎機能低下に伴う高ホモシステイン血症の成因を代謝フラックス法により、また、腎不全に高ホモシステイン血症が合併したときに血管に与える影響をマグヌス法により検討した。その結果、腎機能低下に伴って、Hcyの再メチル化能が低下することが高ホモシステイン血症の成因の一つであることを示唆する知見を得ることができた。しかし、5/6腎切除だけでは、末期腎不全患者で認められるような高ホモシステイン血症モデルを作出できないことが明らかになった。これをふまえて行った薬理学的検討では、NxラットにMet強化食で高ホモシステイン血症を合併させると、5/6腎切除だけに比べてより強く血管障害を惹起することを示唆する知見が得られた。今後、Nxラットの作出法やMet強化食での飼育期間を再検討し、腎不全に合併する血管障害に対して高ホモシステイン血症がどのように関与するかを明確にしていきたい。

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)

Takehisa Matsukawa, Hiroshi Hasegawa, Hitomi Goto, Yoshihiko Shinohara, Atsuko Shinohara, Yuki Omori, Kimiyoshi Ichida, Kazuhito Yokoyama “Evaluation of the metabolic chiral inversion of D-selenomethionine in rats by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry” J Pharm Biomed Anal 116, 59-64 (2015).査読有

〔学会発表〕(計 4件)

長谷川 弘, Li Lei, 稲葉 二郎, 吉岡 亘, Liu LianXun, 市田 公美 「メチオニン強化食により誘導した高ホモシステイン血症が5/6腎摘除ラットの血管弛緩機能に与える影響」日本アミノ酸学会10周年記念大会、2016年9月13日、東京

長谷川 弘, Li Lei, 稲葉 二郎, 吉岡 亘, Liu LianXun, 市田 公美 「高ホモシステイン血症を呈した慢性腎不全モデルラットの血管弛緩機能障害」第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月17日、横浜

長谷川 弘, 松川 岳久, 後藤 瞳, 篠原佳彦, 篠原 厚子, 横山 和仁, 市田 公美 「安定同位体希釈GC-MSによるセレノメチオニン光学異性体の分別定量法の開発とその生体内動態研究」第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年8月21日、長崎

Hiroshi Hasegawa, Yoshihiko Shinohara, Nami Masuda, Takumi Natori, Kimiyoshi Ichida 「Plasma kinetics of D-serine in rats」The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research、2014年9月4日、Utsunomiya, Tochigi

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 弘 (HASEGAWA, Hiroshi)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80218453

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

市田 公美 (ICHIDA, Kimiyoshi)

東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80183169

中村 真希子 (NAKAMURA, Maki ko)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：80447557