

ESI-TOFMS を駆使した透析患者における糖化/酸化ストレス同時測定法の開発と治療介入効果の検証

丸山 徹

熊本大学薬学部薬剤学分野

key words : 酸化ストレス, 血液透析, アルブミン

要 旨

本研究では、腎疾患およびその合併症の病態形成や進展に重要な役割を果たしている酸化ストレスおよび糖化ストレスを同時に評価すべく、質量分析装置 (ESI-TOFMS) によるヒト血清アルブミン (HSA) の翻訳後修飾解析の有用性を、維持血液透析患者および腎不全あるいは糖尿病腎症モデル動物で検証した。その結果、酸化ストレスマーカーとしてシステイン 34 のシステイン付加体 (Cys-HSA)、糖化ストレスマーカーとしてグルコース付加体 (Gly-HSA)、酸化および糖化ストレスマーカーとして Cys-Gly-HSA が活用できることを初めて見出した。この評価系により維持血液透析患者の状態および各種治療法による改善効果を解析したところ、透析患者のほうが健常人や糖尿病患者よりも酸化ストレスが有意に高いこと、また、糖尿病性腎症や巣状糸球体硬化症のほうが酸化ストレスの亢進が顕著であった。透析関連治療における抗酸化療法を探索した結果、online-HDF や活性炭サプリメントによる酸化ストレス軽減効果を見出した。また、経口鉄製剤であるクエン酸第二鉄製剤の場合、静注鉄とは異なり、酸化ストレスを誘導しない可能性を明らかにした。加えて、Cys 化率は血管内皮障害マーカーとしても活用できる可能性が示された。病態モデル動物を用いた検討でも類似した結果を得ることができた。以上、本解析法は維持血液透析患者の病態診断あるいは治療効果判定に対する応用が期待される。

1 目 的

酸化ストレスや糖化ストレスは、腎疾患およびその合併症の病態形成や進展に重要な役割を果たしている。そのため、これら因子の寄与を定量的に解析することは、個々の患者における病態発症や進展機序の解明、あるいは治療効果の判定において有用である。しかしながら、これらの因子を個別に評価できる測定法は存在するものの、両者を同時に解析可能な測定法は存在しない。

我々は、ヒト血清アルブミン (HSA) の翻訳後修飾状態を ESI-TOF マススペクトル (MS) 法により解析した結果、①システイン (Cys) 34 の Cys 付加体 (Cys-HSA) が酸化ストレスを、②グルコース付加体 (Gly-HSA) が糖化ストレスを、③両者の修飾体 (Cys-Gly-HSA) が酸化ストレスと糖化ストレスの両方を反映するマーカーとして活用できる可能性を、慢性肝疾患患者に対する検討から見出してきた。このことは、ESI-TOFMS による HSA の翻訳後修飾解析が酸化ストレスと糖化ストレスの両方を同時に評価できることを意味している。

本研究では、本法を駆使し、維持血液透析患者または病態モデル動物における酸化ストレスと糖化ストレスの寄与を定量的に解析するとともに、各種治療介入の影響について検討した。

2 方法

本研究では、維持血液透析患者 85 名（糖尿病性腎症 52 名、慢性糸球体腎炎 19 名、腎硬化症 14 名）の血漿から HSA 分画を固相抽出し、それらを ESI-TOFMS で解析することにより、HSA の翻訳後修飾状態を解析した。また、腎機能が正常な糖尿病患者 47 名（軽度糖尿病（HbA1C 値 < 7.0%、14 名）、中程度糖尿病（HbA1C 値 \geq 7.0%、33 名）を対象として比較した。慢性腎不全病態動物として、5/6 腎摘ラット・マウス、db/db マウス、アドリアマイシン誘発腎不全マウスを用いた。次に、透析法や透析条件、あるいは薬物療法やサプリメントの摂取が上記三つのマーカーに及ぼす影響について検討した。加えて、上記マーカーと血管内皮障害マーカーとの関連性についても評価した。

本研究は熊本大学実験動物倫理委員会及びあけぼのクリニック倫理委員会で承認された。

3 結果と考察

従来の報告と同様、透析患者におけるアルブミン、特に Cys34 の酸化度は病態群で高く、また病態群でも透析患者のほうが糖尿病患者よりも亢進していた（健康人 < 糖尿病患者 < 透析患者）。ESI-TOFMS により、Cys34 の酸化修飾体を解析したところ、病態群で上昇した酸化修飾体の大部分はシステイン付加体であることが判明した。また少数ではあるが、その中にはブドウ糖が付加している Cys-Gly-HSA も含まれていた。興味深いことに、透析患者の中でも、糖尿病性腎症や巣状糸球体硬化症のほうが他の原疾患よりも Cys 付加率は高値を示した。

このシステイン付加体の修飾様式に関する情報を得るべく、サンプルを還元剤で処理し、ESI-TOFMS で解析したところ、Cys 付加体に由来するピークが大きく減少し、その代わりに Cys34 還元型のピークの増加が観察された。このことは、Cys34 のチオール基にシステインがジスルフィド結合で可逆的に付加していることを意味していた。同様な結果が、Cys-Gly-HSA 体においても観察された。透析前後のサンプルを ESI-TOFMS で解析したところ、透析後において Cys 付加率の低下と還元型 Cys 体含有率の増加が観察された。この変化は、丁度、サンプルを還元剤処理した場合の結果と類似していた。このことから、透析後にはアル

ブミンが還元された状態に回復していることが明らかとなった。

従来、透析療法が酸化ストレスに及ぼす影響に関しては、透析自体や機器との接触により酸化ストレスが亢進するという報告もあれば、逆に酸化ストレスを低下させるという相反する意見が示されている。今回得られた知見は、維持血液透析療法の場合、条件によっては酸化ストレスを軽減するという後者の考えを支持するものであった。最近、台湾のグループから、維持血液透析患者の場合、透析前における Cys34 酸化型 HSA の割合が 52% を超えると、心血管疾患による死亡リスクが増加するという臨床研究結果が報告されている¹⁾。今回の我々の検討では、透析前の Cys 付加率は 60% を超えていたことから、心血管障害のリスクを軽減するためには、透析療法の変更や新たな血液浄化法の適応が必要となる。

そこで、透析条件が酸化ストレスに及ぼす影響について検討した。今回は、ダイアライザーと透析液を 2 週間おきに変更しながら Cys 付加率を測定した。ダイアライザーとしては 3~5 型のを 5 種類使用した。透析液としては、酢酸含有および非含有溶液の二つを比較検討した。当初、5 型ダイアライザーのほうが 3 型のものに比べてタンパク質の漏出能が高いため、Cys 付加率の減少が大きいのではないかと予想していたが、実際には、いずれのダイアライザーに変更しても Cys 付加率の変化は認められなかった。透析液に関しても、酢酸含有の有無による違いは観察されなかった。このように今回の検討では、透析膜および透析液の選択による酸化ストレスの軽減効果を見出すことはできなかった。この理由としては、検討期間が 2 週間と短期間であったことが影響している可能性も考えられる。この点を明らかにするためには、より長期間にわたる観察が必要であると思われた。

次に、血液浄化療法の違いを検討すべく、通常の維持透析から online-HDF への変更が Cys 付加率に及ぼす影響について検討した。online-HDF への変更後の 3 カ月目および 6 カ月目に Cys 付加率を測定したところ、3 カ月目には Cys 付加率の有意な低下が観察され、6 カ月後にはより大きな減少が認められた。このことから、online-HDF への変更は酸化ストレスを軽減する可能性が示された。そのさい、代表的なタンパク結合型尿毒症物質であるインドキシル硫酸の血漿中濃度を測

定したところ、血漿中インドキシル硫酸濃度は時間依存的に低下した。インドキシル硫酸は酸化ストレス誘発物質であることから、online-HDF による酸化ストレスの低減化には、一部インドキシル硫酸の除去向上が関与していることが推察された。事実、インドキシル硫酸の生体内蓄積を阻害する薬用吸着炭 AST-120 に関しては、病態動物実験および CKD 患者を対象とした臨床試験で間接的な抗酸化活性が実証されている。

上述したように、透析により Cys 付加率は顕著に低下するものの、次回の透析時には元の値まで上昇する。このことは、Cys 付加率を定常的に低下させるには、透析間の抗酸化療法が必要であることを示している。ここで、透析間の AST-120 服用は Cys 付加率の低下を大いに期待させるが、本剤の場合は透析患者に対する保険適応を有していない。そのため、AST-120 と同じく、活性炭を主成分とするサプリメントの摂取が Cys 付加化率に及ぼす影響について介入研究を行った。

今回の検討では、この活性炭サプリメントの 6 カプセル（1 日推奨摂取量）を維持血液透析患者へ連日経口投与したところ、摂取 1 カ月後から Cys 付加化率の有意な減少（10% 以上）が観察され、その効果は摂取期間中持続していた。この現象は、同じ活性炭製剤である AST-120 と類似していた。以前、我々は AST-120 がインドキシル硫酸の生体内蓄積を抑制することで、抗酸化効果を発揮することを明らかにしている。そこで、活性炭サプリメントにおいても同様な機序を想定し、摂取期間中の血漿中インドキシル硫酸濃度をモニタリングしたところ、予想に反してインドキシル硫酸濃度の血漿中濃度の低下は観察されなかった。そのため、他の尿毒症物質の関与の有無を確かめるべく、活性酸素誘導能が報告されているパラクレジル硫酸を含む 6 種類の尿毒症物質についても血漿中濃度を測定したが、有意な変動は認められなかった。

これらの結果から、活性炭サプリメントは尿毒症物質以外の酸化ストレス誘発物質（およびその前駆体）を吸着することで抗酸化効果を発揮している可能性が推察された。加えて、活性炭の場合、腸内細菌の環境に影響を及ぼす可能性が指摘されていることから、腸内細菌の変動により酸化ストレスが軽減されたのかもしれない。この点を明らかにするためには、今後、投与された活性炭サプリメントを回収し、各種質量分析法を駆使して結合物質を同定することや、次世代シー

クエンサーによる腸内細菌の解析を行う必要がある。

透析患者では、投与される薬剤によっても酸化ストレスが誘導されることがある。例えば、腎性貧血治療に汎用されている静注鉄は酸化型 HSA の割合を有意に増加させる。これは投与された鉄分子のうち、血漿タンパク質に結合していない遊離型鉄分子がフェントン反応を介して細胞障害性の強いヒドロキシラジカルを産生するためと考えられている。近年、新規リン吸着剤としてクエン酸第二鉄製剤が上市された。本剤はリン吸着効果と鉄補充効果を併せ持つため、CKD-MBD 治療だけでなく、鉄欠乏性の腎性貧血治療への有効性が示されている反面、鉄の蓄積による酸化ストレスの亢進が懸念されている。

この点を明らかにすべく、維持血液透析療法が施行されている CKD-MBD 患者を対象に、クエン酸第二鉄製剤が上述した二つの治療効果を発揮している条件下で、Cys 付加率に及ぼす影響について 6 カ月間の観察研究を行った。その結果、血清フェリチン値は投与前に比べて約 2 倍上昇したことから鉄の蓄積が示唆された。一方、Cys 付加率に関しては、観察期間を通じて有意な変化は認められなかった。同様な結果が、他の酸化ストレスマーカーや抗酸化マーカーにおいても得られた。これらの結果から、鉄欠乏患者に対するクエン酸第二鉄製剤の経口投与が酸化ストレスを誘導しないことを初めて明らかにすることができた。この原因として、クエン酸第二鉄製剤の場合、経口剤であるため、血中への移行性が緩徐であり、遊離鉄濃度が上昇しないためではないかと推察された²⁾。

糖尿病患者を対象として、HbA1C 値と Gly-HSA および Cys-Gly-HSA との関連性について検討した。その結果、両者の間に有意な相関関係が得られた。そのさい、合併症予防のための目標値である HbA1C 値 7.0% を基準として再解析すると、高値群は低値群と比較して Cys-Gly-HSA の値が有意に高かった。同様な結果は糖尿病性腎症による透析患者でも認められた。このことから腎症合併や進展における酸化ストレスの関与が示唆された。

維持血液透析患者における死因の第一位は心血管疾患であり、その発症や進展には血管内皮障害が重要な役割を果たしている。昨年、我々は心不全患者を対象とした臨床研究で、血漿プテリジン類濃度が End-PAT から算出した血管内皮機能と相関することから、

バイオマーカーとして有用であることを報告した³⁾。血管内皮障害の危険因子には酸化ストレスや糖化ストレスも含まれることから、血漿プテリジン類濃度とCys付加率、Gly-HSA率、Cys-Gly-HSA率との間にも関係性があるのではと考え、維持血液透析患者を対象として両者の相関性について検討した。その結果、Cys-HSA率は血漿中プテリジン類濃度と良好な相関性を示した。このことから、透析患者の場合も血管内皮障害に対して酸化ストレスが関与していること、さらにCys化率が酸化ストレスマーカーとしてだけでなく、血管内皮障害のマーカーとしても活用できる可能性が示された。上述した検討と類似した結果が、病態モデル動物においても認められた。

4 結 論

本研究では、HSAの翻訳後修飾状態をESI-TOFMSで解析することにより、維持血液透析患者における酸化ストレスと糖化ストレスの両方を同時に評価できることを初めて明らかにすることができた。本測定法により、透析患者では酸化ストレスや糖化ストレスが亢進しており、これらが病態発症・進展において重要な役割を果たしていることが確かめられた。また、透析患者における酸化ストレスや糖化ストレスの差異は原疾患にも起因することが示された。

維持血液透析患者を対象として、各種治療法が酸化ストレスおよび糖化ストレスに及ぼす影響を検討した結果、透析療法自身が抗酸化作用を発揮するが、online-HDFや活性炭サプリメントの摂取により抗酸化活性の上乗せ効果が得られたことから、これらの介入は酸化ストレスを軽減する可能性が示された。他方、経口リン吸着薬であるクエン酸第二鉄製剤の場合、静注鉄製剤とは異なり、酸化ストレスを上昇させないことを明らかにした。これらの結果から、ESI-TOFMS

によるCys34付加率の測定は、維持血液透析患者の病態や治療効果の酸化ストレス、あるいは抗酸化効果を評価する酸化ストレスマーカーとして有用であることが示された。また、今後さらなる検討が必要ではあるものの、Cys付加率が血管内皮障害マーカーとしても活用できる可能性を見出した。加えて、Cys-Gly-HSA率が腎症をはじめとする糖尿病合併症の予測マーカーとなりうる可能性も示された。

ESI-TOFMSはサンプル処理からデータ解析までの一連の過程を迅速、簡便かつハイスループットで遂行できるため、多検体の測定に適している。したがって、本法により算出されるHSAのCys付加率や糖化率の臨床検査への応用がおおいに期待される。

平成26年度日本透析医学会公募研究助成により得られた成果は、①Biological & Pharmaceutical Bulletin (in press), ②Journal of Pharmaceutical Sciences, ③Clinical Chimica Actaに投稿中または投稿を予定しているため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

文 献

- 1) Lim PS, Jeng Y, Wu MY, et al. : Serum oxidized albumin and cardiovascular mortality in normoalbuminemic hemodialysis patients : a cohort study. PLoS One 2013 8(7) : e70822. doi : 10.1371/journal.pone.0070822.
- 2) Tanaka M, Miyamura S, Imafuku T, et al. : Effect of a Ferric Citrate Formulation, a Phosphate Binder, on Oxidative Stress in Chronic Kidney Diseases-Mineral and Bone Disorder Patients Receiving Hemodialysis : A Pilot Study. Biol Pharm Bull. 2016; 39 : 1000-6.
- 3) Yamamoto E, Hirata Y, Tokitsu T, et al. : The pivotal role of eNOS uncoupling in vascular endothelial dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction. Int J Cardiol 2015; 190 : 335-337.