

東海大学大学院令和4年度博士論文

生体における非酵素的翻訳後修飾の
加齢関連疾患に対する役割の検討

指導 永井 竜児 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

勝田 奈那

略語一覧表

ADP	Adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
AGEs	Advanced glycation end-products (終末糖化産物)
ANCA	Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (抗好中球細胞質抗体)
AST	Aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
ATP	Adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
AUC	Area under the curve (曲線下面積)
B	Partial regression coefficient (偏回帰係数)
BCA	Bicinchoninic acid (ビシンコニン酸)
BMI	Body mass index (ボディマス指数)
CEL	<i>N</i> ^ε -(carboxyethyl)lysine
CI	Confidence interval (信頼区間)
CKD	Chronic kidney disease (慢性腎臓病)
CML	<i>N</i> ^ε -(carboxymethyl)lysine
CsA	Cyclosporine (シクロスポリン)
eGFR	Estimated glomerular filtration rate (推算糸球体濾過量)
ESRD	End-stage renal disease (末期腎不全)
FH	Fumarate hydratase (フマル酸ヒドラターゼ)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)
GBM	Glomerular basement membrane (糸球体基底膜)
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (ガスクロマトグラフィー質量分析装置)
GLO1	Glyoxalase I (グリオキサラーゼ I)
HbA1c	Hemoglobin A1c (ヘモグロビン A1c)
HCl	Hydrochloric acid (塩酸)
HDL	High-density lipoprotein (高比重リポタンパク質)
H-ESI	Heated electrospray ionization (加熱エレクトロスプレーイオン化)
HLRCC	Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (遺伝性平滑筋腫症腎細胞癌)
IgA	Immunoglobulin A (免疫グロブリン A)
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置)
LDL	Low-density lipoprotein (低比重リポタンパク質)
MG	Methylglyoxal (メチルグリオキサール)
MG-H1	<i>N</i> ^δ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine
MPGN	Membranoproliferative glomerulonephritis (膜性増殖性糸球体腎炎)
NA	Not applicable (該当なし)

NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)
NAD ⁺	Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)
NaOH	Sodium hydroxide (水酸化ナトリウム)
NMN	Nicotinamide mononucleotide (ニコチンアミドモノヌクレオチド)
PEKT	Pre-emptive kidney transplantation (先行的腎移植)
ROC	Receiver operating characteristic (受信者動作特性)
RPGN	Rapidly progressive glomerulonephritis (急速進行性糸球体腎炎)
PTM	Post-translational modification (翻訳後修飾)
QOL	Quality of life (生活の質)
r_s	Spearman's rank correlation coefficient (スピアマンの順位相関係数)
SCr	Serum creatinine (血清クレアチニン)
SD	Standard deviation (標準偏差)
SE	Standard error (標準誤差)
SPE	Solid-phase extraction (固相抽出)
TCA	Trichloroacetic acid (トリクロロ酢酸)
TFA	Trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
vs.	versus
VUR	Vesicoureteral reflux (膀胱尿管逆流)
WHO	World Health Organization (世界保健機関)
2SC	<i>S</i> -(2-Succinyl)cysteine
β	Standardized partial regression coefficient (標準化偏回帰係数)

目次

要旨	1
緒言	3
第1章 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動	
1. 背景	7
1-1. 加齢とは	
1-2. 加齢と AGEs	
1-3. 加齢とミトコンドリア、2SC	
2. 実験方法	9
2-1. 動物実験	
2-2. 組織中 2SC 値測定のための前処理	
2-3. 組織中 AGEs 値測定のための前処理	
2-4. LC-MS/MS による 2SC および AGEs の測定	
2-5. 組織破碎液中フマル酸の測定	
2-6. 統計解析	
3. 結果	14
3-1. 加齢に伴う組織中 2SC の変動	
3-2. 加齢に伴う組織中 AGEs の変動	
3-3. 加齢に伴う組織中フマル酸の変動	
4. 考察	19
5. 小括	21
第2章 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動	
1. 背景	22
1-1. 腎臓の位置と構造	
1-2. 腎臓の働き	
1-3. 腎機能低下とその診断	
1-4. CKD 増悪による末期腎不全への進展および治療方法	
1-5. 世界および日本における腎臓病の現状	
1-6. 腎臓および CKD と AGEs の関連	
1-7. 腎臓とミトコンドリアの関連	
1-8. 血中代謝物測定の意義	
2. 実験方法	27
2-1. サンプル	
2-2. 後ろ向き横断研究	
2-3. 縦断研究	

2-4. 遊離型 2SC 値測定のための血清の前処理	
2-5. 遊離型 AGEs 値測定のための血清の前処理	
2-6. LC-MS/MS による 2SC および AGEs の測定	
2-7. 血清中フマル酸の測定	
2-8. 統計解析	
3. 結果	32
3-1. 後ろ向き横断研究: 健常群および腎移植を行った患者の血中代謝物の比較	
3-2. 縦断研究: 腎移植前後の血中代謝物の変化	
3-3. 血中代謝物と既存の腎機能マーカーの相関関係	
3-4. ROC 曲線	
3-5. 重回帰分析	
4. 考察	42
5. 小括	44
総括	45
使用した試薬	47
使用した器具・機器	48
謝辞	50
参考文献	51
本論文に関わる報告	59

要旨

近年、心血管疾患や糖尿病など加齢関連疾患の患者が急増しているが、それら病態の要因は遺伝子変異やタンパク質発現の変動だけでは説明できない部分があり、翻訳後修飾 (Post-translational modification: PTM) の観点からも研究が行われている。PTMのうち、タンパク質のN末端やε-アミノ基にグルコース等の還元糖やジカルボニル化合物がメイラード反応により結合して Advanced glycation end-products (AGEs) が生成され、生体タンパク質の変性に関与することが知られている。また最近、ミトコンドリアの機能異常に伴い Tricarboxylic acid (TCA) 回路中間体であるフマル酸が酵素の活性部位等に存在するシステインのチオール基と Succination によって結合し S-(2-succinyl)cysteine (2SC) が生成されることが見いだされている。多くの先行研究において 2SC は、抗体を用いた免疫化学的手法やガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いて測定が行われているが、定性分析であることや測定対象物を誘導体化するための多段階処理が必要等の問題点がある。本研究では、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて、(1) 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動、(2) 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動について検討した。

(1) 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動:

「加齢」は様々な疾患のリスクファクターであり、脳においては神経変性や認知機能低下との関連が示唆されている。また、肝臓や腎臓の機能も加齢に伴い低下する。ヒト関節軟骨および皮膚コラーゲン、水晶体における AGEs は加齢に伴い増加することが報告されているが、2SC と加齢に関しては知見が乏しい。本研究では LC-MS/MS を用いた生体組織中 2SC の測定系を確立し、若齢および老齢マウス組織中 PTM の測定を試みた。

4, 12, 96 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを解剖し、脳、肝臓および腎臓を採取した。組織の破碎、脱脂や加水分解等の前処理を行った後、LC-MS/MS を用いて 2SC および酸化依存性 AGEs の N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML)、糖代謝異常において生成される N^δ-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) を測定し、2SC 前駆体であるフマル酸値とも比較した。

その結果、脳中 2SC は他の臓器と比較して顕著に高く、その蓄積量は週齢依存的に有意に増加した。肝臓中 2SC は 12 週齢と比較して 96 週齢で有意に高値を示したが、腎臓においては加齢による変化は認められなかった。一方、脳中フマル酸はいずれの週齢でも同程度であったのに対し、肝臓および腎臓においては加齢に伴い有意に増加した。また、CML は脳と腎臓で加齢に伴い有意に増加したが、MG-H1 は腎臓においてのみ変動が認められた。

本研究では、加齢に伴う PTM の蓄積は構造や組織によって異なることが示された。その違いは前駆体や酸化ストレスの変動、臓器の代謝を反映している可能性があり、特に脳と腎臓の代謝は加齢により影響を受けやすいことが示唆された。

(2) 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動:

慢性腎臓病 (CKD) が進行し末期腎不全になると、透析や腎移植が必要となり、生活の質は著しく低下する。腎機能に必要なエネルギー産生の大半はミトコンドリアによる代謝に依存しているため、その異常は腎機能に多大な影響を及ぼす可能性が指摘されている。血中代謝物は組織における異常や機能不全を反映する。よって、その測定は病態の進行度を評価するバイオマーカーとなるのみならず、病態の発症・進行メカニズム解明のために重要であると考えられる。本研究では LC-MS/MS による液体試料中 2SC の測定方法を確立し、ヒト血清中代謝物の変動を評価した。

腎ドナー患者 (22 検体) および腎移植患者 (110 検体) 血清から脂質や低極性物質を除去し、濾過等の前処理を行った。その後、LC-MS/MS を用いて遊離型 2SC および CML、MG-H1 を測定し、フマル酸値や腎機能との関連を評価した。

その結果、腎機能低下に伴い 2SC および AGEs は有意に増加し、腎移植によって顕著に低下した。一方、フマル酸値は末期腎不全状態でのみ変動が認められた。2SC および CML、MG-H1 は既存の腎機能マーカーである血清クレアチニン値および推算糸球体濾過量 (eGFR) との相関が認められた。Receiver operating characteristic curve (ROC 曲線) から曲線下面積を算出した結果、2SC が最も高値を示した。さらに、2SC 値は血清クレアチニン値および年齢、性別の影響を受けることが重回帰分析によって示唆された。

腎機能低下に伴い腎臓において産生が増大したフマル酸が腎組織を修飾し、2SC が産生、血中へと放出されたと推測される。フマル酸産生は増加しても直ちに代謝される、あるいは Succination によって消費されるため、腎機能が顕著に悪化しなければ血中での変動が検出されにくいと考えられた。CKD における血中 AGEs の変動に関しては多くの先行研究と同様、生成の増加や腎クリアランス低下、AGEs 前駆体であるジカルボニル化合物を代謝する酵素のダウンレギュレーション等が要因であると考えられる。本研究は CKD におけるミトコンドリア代謝異常の関与を裏付けるものであり、2SC と腎機能の関係を明らかにした最初の報告である。

緒言

World Health Organization (WHO) の 2020 年の報告によると近年、心血管疾患、循環器疾患、がん、糖尿病、腎臓病等の非感染性疾患が増加しており、世界の死因の約 70%を占めている (Fig. 1)^(1,2)。これら病態は、加齢に伴い発症、進行することから、「加齢関連疾患 (age-related disease)」とも呼ばれる。

加齢関連疾患の多くは発症初期には自覚症状が無いことが多いが、進行すると脳梗塞や心疾患等の重篤な状態となり完治が困難になる可能性が高い。また、Quality of life (QOL) の低下や要介護状態、医療費増加等の原因にもなり、患者とその家族、ひいては社会全体に大きな負担をもたらす⁽³⁾。したがって、発症の予防や、早期に発見して治療に繋げることが重要である。

加齢関連疾患の発症や進行の一因として翻訳後修飾 (post-translational modification: PTM) の研究が進められている。多くのタンパク質は翻訳時および後に修飾を受け、その機能や活性、局在等が調節される (Fig. 2)⁽⁴⁾。リン酸化やメチル化、アセチル化等の酵素的な PTM はタンパク質機能の制御に不可欠だが、非酵素的な PTM である succination やメイラード反応は、アミノ酸側鎖の修飾や架橋の形成によってタンパク質の構造を変化させ、機能低下を引き起こす。生体においてグルコースが代謝され、解糖系、tricarboxylic acid cycle (TCA 回路)、酸化リン酸化を経てエネルギーの源となるアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) が産生される。その過程で生成される代謝中間体によって様々なタンパク質が修飾され、非酵素的な PTM 産物が生成される。

TCA 回路中間体であるフマル酸が、Cysteine のチオール基と Michael 付加反応によって結合し S-(2-succinyl)cysteine (2SC) が生成される反応は Succination と呼ばれている (Fig. 3)⁽⁵⁾。チオール基は酵素の活性部位を構成したり、ジスルフィド結合によってタンパク質の立体構造を形成する等、生体において重要な役割を担っている。そのため、フマル酸による修飾は酵素の機能低下や分泌不全を引き起こし、その結果、細胞機能に障害を及ぼすことが考えられる。先行研究において、解糖系酵素である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の Cys-149 と Cys-244 が修飾され不活性化する⁽⁶⁾、インスリン抵抗性改善作用等を有するアディポネクチンの重合が阻害され脂肪細胞外への分泌が抑制される等⁽⁷⁾、主に糖尿病との関連が明らかになっている。

終末糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) は、タンパク質の N 末端やε-アミノ基にグルコース等の還元糖やジカルボニル化合物のカルボニル基が結合することで最終的に生成される構造の総称である (Fig. 4)⁽⁸⁾。これはメイラード反応、グリケーション、糖化、あるいは反応基の名前からアミノ・カルボニル反応と呼ばれている。本反応は前駆体が反応してシッフ塩基を形成した後、1,2-エナミノールを経てアマドリ転位生成物ができるまでの前期反応と、酸化・脱水・縮合によって不可逆的に AGEs が生成されるまでの後期反応に分けられる。蛍光性や褐色変化、架橋形成等の特徴を有する AGEs は、現在までに約 40 種類ほどが報告されており、その前駆体や生成経路は多種多様である⁽⁸⁾。生体タンパク質の

AGEs 化は、タンパク質間の架橋形成や陰性荷電増加によって立体構造変化や酵素の活性低下等を引き起こす⁽⁸⁾。糖尿病⁽⁹⁾や動脈硬化⁽¹⁰⁾、白内障⁽¹¹⁾、骨粗鬆症⁽¹²⁾等、多くの病態の発症や進行への関与が示唆されている。AGEs として最も研究されている *N*^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) はグルコースの自己酸化や脂質過酸化反応により生成されるグリオキサールと Lysine との反応、あるいはシッフ塩基等から産生されるグリコールアルデヒドと Lysine との反応、アマドリ化合物の酸化からも生成されるため、酸化ストレスマーカーとして知られている⁽¹³⁻¹⁵⁾。*N*⁶-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) はアマドリ化合物の酸化や解糖系、ケトン体分解物であるアセトールから産生されるメチルグリオキサール (methylglyoxal: MG) と、Arginine の反応から生成され糖質代謝異常との関連が報告されている構造である^(14, 16-19)。

PTM 産物は抗体を用いた免疫化学的手法やガスクロマトグラフィー質量分析装置 (gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) による測定が広く行われている。抗体を用いた測定は簡便かつ組織中 PTM の局在を明らかにできる等の利点があるが、定量性は低い。GC-MS 法による組織中 PTM 定量の報告もあるが、サンプルの前処理において測定対象物を誘導体化するための多段階処理を行う必要があり処理が煩雑な上、測定対象物そのものを測定することはできない。

本研究では、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) を用いて、誘導体化せずに 2SC を測定する手法を確立し、生体サンプル中の含量を測定した。2SC に関しては、タンパク質同定のために LC-MS/MS が用いられているが⁽²⁰⁾、生体試料中 2SC の定量に用いられた報告は乏しい。また、病態との関連が極めて多く報告されている AGEs と、2SC 前駆体であるフマル酸も測定することで、2SC との関連を検討した。

第 1 章では、若齢および老齢マウス組織中 PTM を測定し、加齢に伴う変動について検討を行う。第 2 章では、ヒト血清中 PTM を測定し、腎機能に伴う変動について評価した。

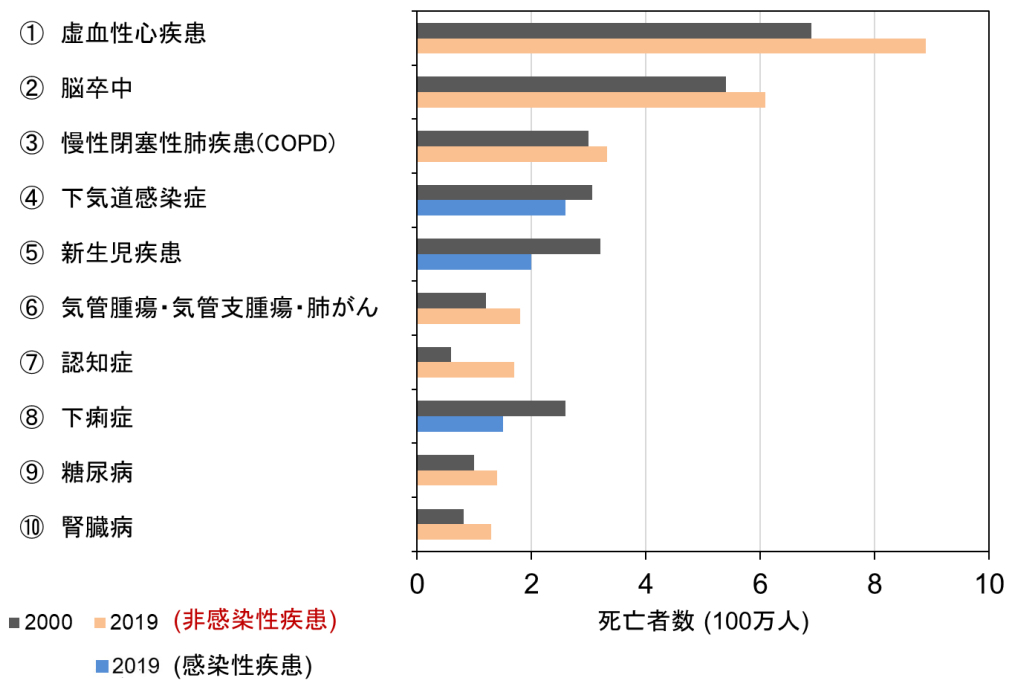


Fig. 1: 世界の主要な死因トップ10

WHOのGlobal Health Estimatesが公表している「The top 10 causes of death」(2020年12月9日)を改変し作成した。2000年と比較して2019年において、感染性疾患(④, ⑤, ⑧)による死亡者数は減少している一方で、非感染性疾患(①, ②, ③, ⑥, ⑦, ⑨, ⑩)では増加した。非酵素的なPTMであるAGEsは、心血管疾患や糖尿病、腎臓病の発症・進行に関与することが示唆されている。

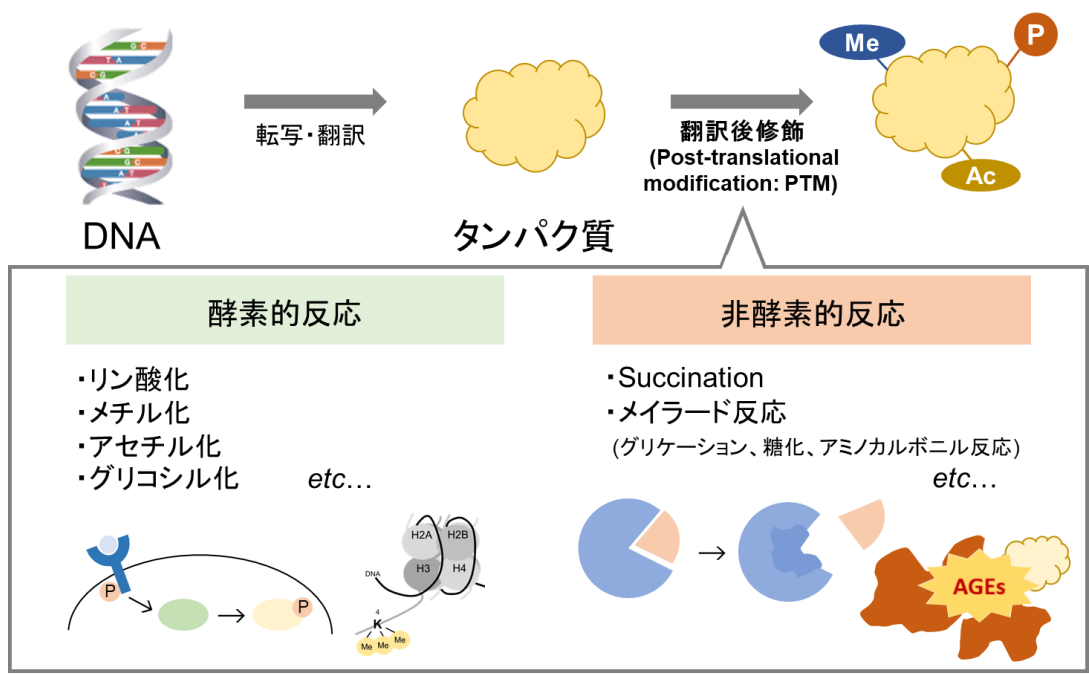


Fig. 2: 翻訳後修飾

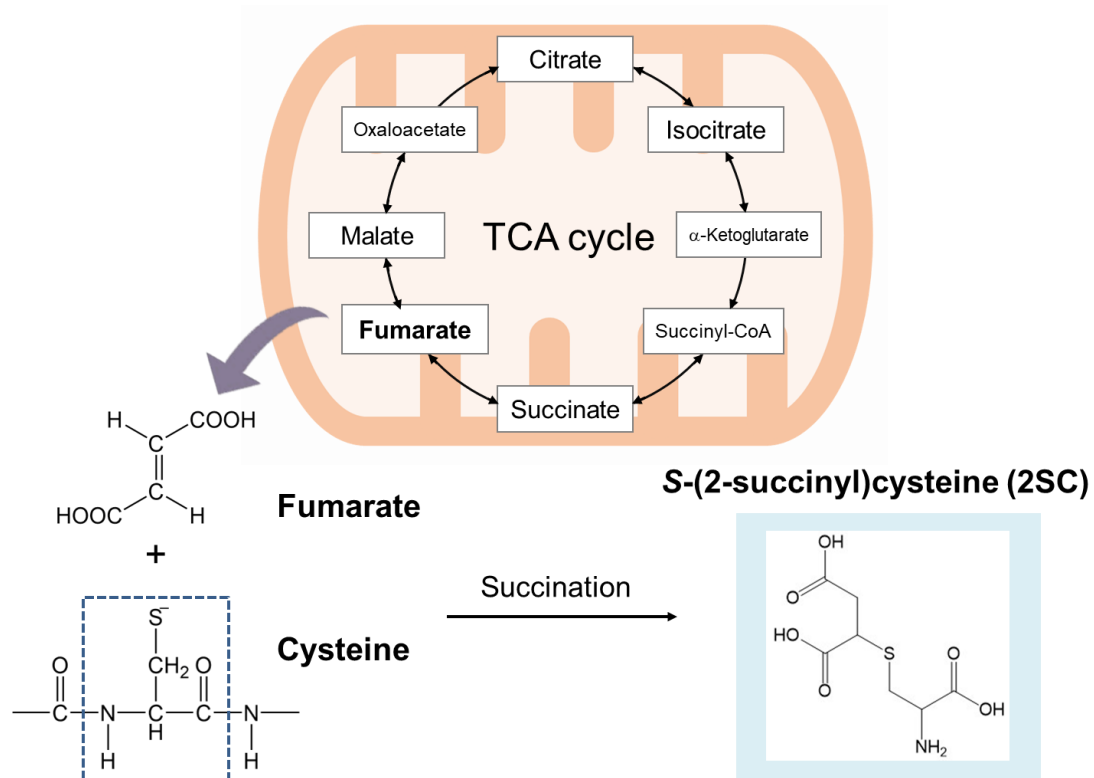


Fig. 3: 2SCの生成

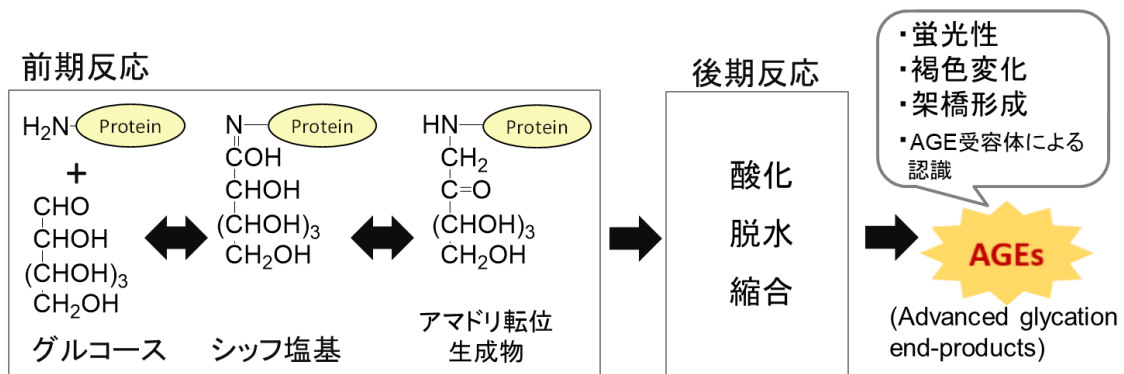


Fig. 4: AGEsの生成経路と特徴

メイラード反応は、還元糖のアルデヒド基が N 末端アミノ基やε-アミノ基と反応してアマドリ転位生成物ができるまでの前期反応と、酸化、脱水、縮合によって不可逆的に進行する後期反応に分けられる。最終的に、蛍光性や褐色変化などの特徴を有する AGEs が生成する。

第1章 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動

1. 背景

1-1. 加齢とは

加齢 (aging) と老化 (senescence, aging) は混同されがちであるが、「加齢」とは一般に、生物が誕生してから死ぬまでの時間経過を表す言葉である。一方、「老化」とは成熟期 (ヒトの場合はおよそ 20~30 歳) 以降の不可逆的な生理機能の低下と考えられる⁽²¹⁾。つまり加齢に伴う心血管、腎、呼吸機能等の低下が老化であり、その始まりや速度、程度に個人差はあれど誰にでも起こる現象である⁽²²⁾。

加齢がリスクファクターとされている病態は多く、特に、脳においては認知機能低下や神経変性が引き起こされる^(23,24)。これはアルツハイマー型認知症の発症率が 70 歳を超えると急激に上昇することからも示唆されている^(25, 26)。また、肝臓や腎臓の機能は加齢に伴い低下し、構造も変化する^(27, 28)。

1-2. 加齢と AGEs

生体 AGEs は病態のみならず、加齢に伴い増加するという多数の報告がある。Sell らは、ヒト脳硬膜コラーゲンより蛍光性 AGEs の一種である Pentosidine を単離・同定し、それが加齢に伴い増加することを明らかにした⁽²⁹⁾。他に、ヒト大腿骨中 Pentosidine やヒト水晶体中 CML および CEL、ヒト関節軟骨および皮膚コラーゲンにおける CML、N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL)、Pentosidine 濃度が年齢に相関して増加すること等が報告されている⁽³⁰⁻³²⁾。AGEs の生成経路からもわかる通り、酸化ストレスはメイラード反応を亢進する因子である。加齢に伴う酸化ストレスの亢進により AGEs が蓄積し、加齢関連疾患の悪化に関与する⁽³³⁾。

1-3. 加齢とミトコンドリア、2SC

加齢に伴い、ミトコンドリア生合成の低下、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異、活性酸素種産生の増加、核 DNA 内の mtDNA 断片の蓄積、ミトコンドリアタンパク質の脂質過酸化の増加等が引き起こされる⁽³⁴⁻³⁷⁾。また、機能不全を起こしたミトコンドリアを除去するマイトファジーが低下し、損傷したミトコンドリアが蓄積することにより細胞死と炎症が促進されることが示唆されている^(38, 39)。機能不全のミトコンドリアは、主に分裂終了細胞で構成される組織 (筋細胞や神経細胞等) において加齢とともに蓄積することが報告されている^(40, 41)。

Alderson ら (2006) は、ヒト皮膚コラーゲン中 2SC が加齢に伴い増加することを GC-MS による測定で明らかにした⁽⁴²⁾。また、ヒトやマウスの脳・中枢神経系における 2SC 測定の報告もあるが、いずれも加齢による有意な変動は検出されていない⁽⁴³⁻⁴⁵⁾。

加齢に伴う PTM 産物の蓄積について明らかにすることは、加齢がリスクファクターとなる病態の発症や進行メカニズムの解明に寄与すると考えられる。しかしながら、2SC の加齢

に伴う変動を検討した報告は AGEs と比べて乏しいのが現状である。

本研究では、生体組織における LC-MS/MS を用いた 2SC の測定系を確立し、4, 12, 96 週齢マウス組織における 2SC およびフマル酸、AGEs の加齢に伴う蓄積量の変動について評価した。

2. 実験方法

2-1. 動物実験

動物実験は東海大学動物実験倫理審査委員会の承認 (承認番号 211019) を得て実施した。雄性の C57BL/6J マウス (3, 11, 95 週齢) を Charles River Laboratories Japan (Kanagawa, Japan) より購入した。マウスは Specific pathogen free 環境下 (12 時間/12 時間明暗周期下、 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$) で 1 週間飼育し馴化させた。飼育中は CRF-1 diet (Charles River Laboratories Japan) および水道水を自由摂取させた。

飼育期間終了後、水のみ自由摂取させながら 6 時間絶食し、解剖を行った。20% (v/v) イソフルラン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) 含有エタノールで麻酔し、心臓から全血を採取した後、0.9% (w/v) 塩化ナトリウム含有水溶液 (生理食塩水) で全身を灌流し脱血した。測定対象とする組織は、採取および破碎が容易であること、十分なタンパク量を確保できること、本研究室における予備試験で測定した経験があること等から考慮し、脳、肝臓、腎臓に決定した。各組織を採取し、生理食塩水で組織表面を洗浄した。

さらに、組織毎に測定部位を摘出した。全脳を頭蓋骨から取り出して正中面で切断し、右脳を PTM 産物測定用に保存した。肝臓から外側左葉を切り出し、その長辺の中央で切断し、片側を測定に供した。右腎臓を冠状面で切断し、片側を測定に用いた。組織は液体窒素で直ちに凍結した後、使用時まで -80°C で保存した。全血は室温 (25°C) で 1 時間静置した後、 $3000 \times g$ 、 20°C で 15 分間遠心分離し、血清を採取して使用するまで -80°C で保存した。

2-2. 組織中 2SC 値測定のための前処理

2SC の標準品は先行研究と同様に L-Cysteine と N-ethylmaleimide の反応から作製し⁽⁴²⁾、Lysine の標準品は L(+)-Lysine 塩酸塩 (99%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を蒸留水で溶解し調製した。 $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_1]$ 2SC は、L-Cysteine ($\text{U-}^{13}\text{C}_3$ 97-99%; ^{15}N 97-99%, Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) と N-ethylmaleimide を反応させ合成した⁽⁴²⁾。 $[^{13}\text{C}_6]$ lysine (99%) は Cambridge Isotope Laboratories から購入した。また、先行研究と同様にアミノ酸分析により溶液の濃度を算出した⁽⁴⁶⁾。

Triton X-100 水溶液 (5%, v/v; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を組織に添加し、POLYTRON® Homogenizers (PT 10-35 GT; Kinematica AG, Malters, Switzerland) および Teflon homogenizer (BioMasher II, Nippi, Tokyo, Japan)、Ultrasonic Disruptor (TOMY, Tokyo, Japan) を用いて液状になるまでホモジナイズした。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて bicinchoninic acid (BCA) 法により測定した。

組織サンプル (タンパク質 100 μg) 約 1~5 μL を蒸留水に加え、全量を 20 μL とした。サンプルに 800 μL の冷クロロホルム/メタノール (2:1, v/v; -20°C) を加え混合し、 4°C 、15 分間、 $13,761 \times g$ で遠心分離を行った。上清を除去し、脱脂を行った。沈殿物に蒸留水 100 μL と 10% (w/v) トリクロロ酢酸 (Trichloroacetic acid: TCA) 水溶液 800 μL を添加、混合し、 4°C 、15 分間、 $13,761 \times g$ で遠心分離後、上清を除去した。前処理による測定値の変動を補

正するため、沈殿物に内部標準として 10 μM [$^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_1$] 2SC を 5 μL 、1 mM [$^{13}\text{C}_6$] lysine を 5 μL 添加し、6 M 塩酸 (hydrochloric acid: HCl) 150 μL を加えて 100°C、18 時間インキュベーションし加水分解を行った。遠心濃縮によって塩酸を除去した後、700 μL の蒸留水で再溶解し、2.1 mL の 0.1% (v/v) ギ酸含有メタノールが入った Captiva ND^{Lipids} cartridge (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に通し、溶出画分を回収した。その画分を吹付け式試験管濃縮装置 (MG-2200; Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) によって乾固し、1% (v/v) ギ酸含有水 1 mL で再溶解した。その溶液を、メタノール 1 mL で予洗し、1% (v/v) ギ酸含有水 3 mL で平衡化した Sep-Pak C18 3 cc Vac Cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA) にかけて。さらに、2 mL の 1% (v/v) ギ酸含有 20% (v/v) メタノール水溶液を溶出させ、得られた計 3 mL の画分を吹付け式試験管濃縮装置で乾固した。それを 20% (v/v) アセトニトリルおよび 0.1% (v/v) ギ酸を含む水 1 mL で再溶解し、VIVASPIN 500 filter (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) でフィルター濾過した。

2-3. 組織中 AGEs 値測定のための前処理

CML および MG-H1 の標準品は先行研究と同様に作製した^(46,47)。 [$^2\text{H}_2$] CML (99%) および [$^2\text{H}_3$] MG-H1 (97.4%) は PolyPeptide Laboratories France SAS (Strasbourg, France) から購入した。また、先行研究と同様にアミノ酸分析を行い、濃度を明らかにした⁽⁴⁶⁾。

前処理は先行研究に基づいて行った⁽⁴⁸⁾。組織サンプル (タンパク質 300 μg) 約 6~19 μL を蒸留水に加え、全量を 25 μL とした。そこにサンプルと等量 (50 μL) の 100 mM sodium borate buffer (pH 9.1) と、10 分の 1 量 (5 μL) の 2 M 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 0.1 M 水酸化ナトリウム (NaOH, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 水溶液を添加し、25°C で 4 時間静置し還元処理を行った。サンプルに 20% (w/v) TCA 水溶液 800 μL を添加、混合し、4°C、15 分間、13,761 \times g で遠心分離後、上清を除去した。内部標準として 1 μM の [$^2\text{H}_2$] CML (10 μL)、1 μM [$^2\text{H}_3$] MG-H1 10 μL 、1 mM [$^{13}\text{C}_6$] lysine 5 μL および 6 M HCl 1 mL を沈殿物に加え、100°C、18 時間インキュベーションし加水分解を行った。遠心濃縮によって塩酸を除去した後、1 mL の蒸留水で再溶解した。それを、1 mL メタノールで予洗し、1 mL の蒸留水で平衡化した Strata-X-C column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) にサンプルを通し、2% (v/v) ギ酸含有水 3 mL で洗浄した後、7% (v/v) アンモニア含有水 3 mL で溶出させた。計 3 mL の溶出画分を吹付け式試験管濃縮装置で乾固した。20% (v/v) アセトニトリルおよび 0.1% (v/v) ギ酸を含む水 1 mL で再溶解、0.45 μm フィルター (Syringe-driven Filter Unit Millex-LH; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で濾過した。

2-4. LC-MS/MS による 2SC および AGEs の測定

PTM の定量は、同位体標識および非標識標準品の混合物からなる検量線を用いた内部標準法によって実施した。

LC 分離は UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。サンプル

(10 μ L) は溶媒 A (0.1% [v/v] ギ酸含有水) と溶媒 B (0.1% [v/v] ギ酸含有アセトニトリル) から成る 2 成分分離によって SeQuant[®] ZIC[®]-HILIC column (150 \times 2.1 mm, 5 μ m, 200 \AA ; Merck KGaA) から溶出した。グラジエント条件は以下に示す通りである: 90% B at 0–2 min, 90% to 10% B at 2–16 min, 10% B at 16–19 min, and 90% B at 19.1–23 min。流量は 0.2 mL/min at 0–19.2 min, and 0.4 mL/min at 19.2–23 min であり、カラム温度は 40°C に維持した。2SC および CML、MG-H1 の溶出時間は 10–14 min だった。MS 部は加熱エレクトロスプレーイオン化源 (heated electrospray ionization [H-ESI] source, Thermo Fisher Scientific) を備えた TSQ Quantiva triple-stage quadrupole mass spectrometer を用いた。

MS はポジティブイオンモードで、以下の条件で行った: スプレー電圧, 3500 V; sheath gas, 35 arb; aux gas, 15 arb; ion transfer tube 温度, 270°C; vaporizer 温度, 250°C。衝突誘起解離 (collision-induced dissociation [CID]) は コリジョンガスとしてアルゴンを用い、2 mTorr の圧力で行った。

MS/MS 測定は 選択反応モニタリング (selected reaction monitoring: SRM) で行った。2SC、CML、MG-H1、Lysine のプリカーサーイオンおよびフラグメントイオンを Table 1 に示す。2SC および AGEs 量は Lysine およびタンパク質量で正規化した。測定対象の構造式および内部標準の標識位置を Fig. 5A–C に示す。

Table 1: LC-MS/MS により検出された 2SC, AGEs, Lysine のプリカーサーイオンおよびフラグメントイオン

Analyte	Polarity	Collision energy (V)	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)
2SC	Positive	14	238	149
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N ₁] 2SC		14	242	149
CML		11	205	130
[² H ₂] CML		12	207	130
MG-H1		14	229	114
[² H ₃] MG-H1		15	232	117
Lysine		15	147	84
[¹³ C ₆] lysine		15	153	89

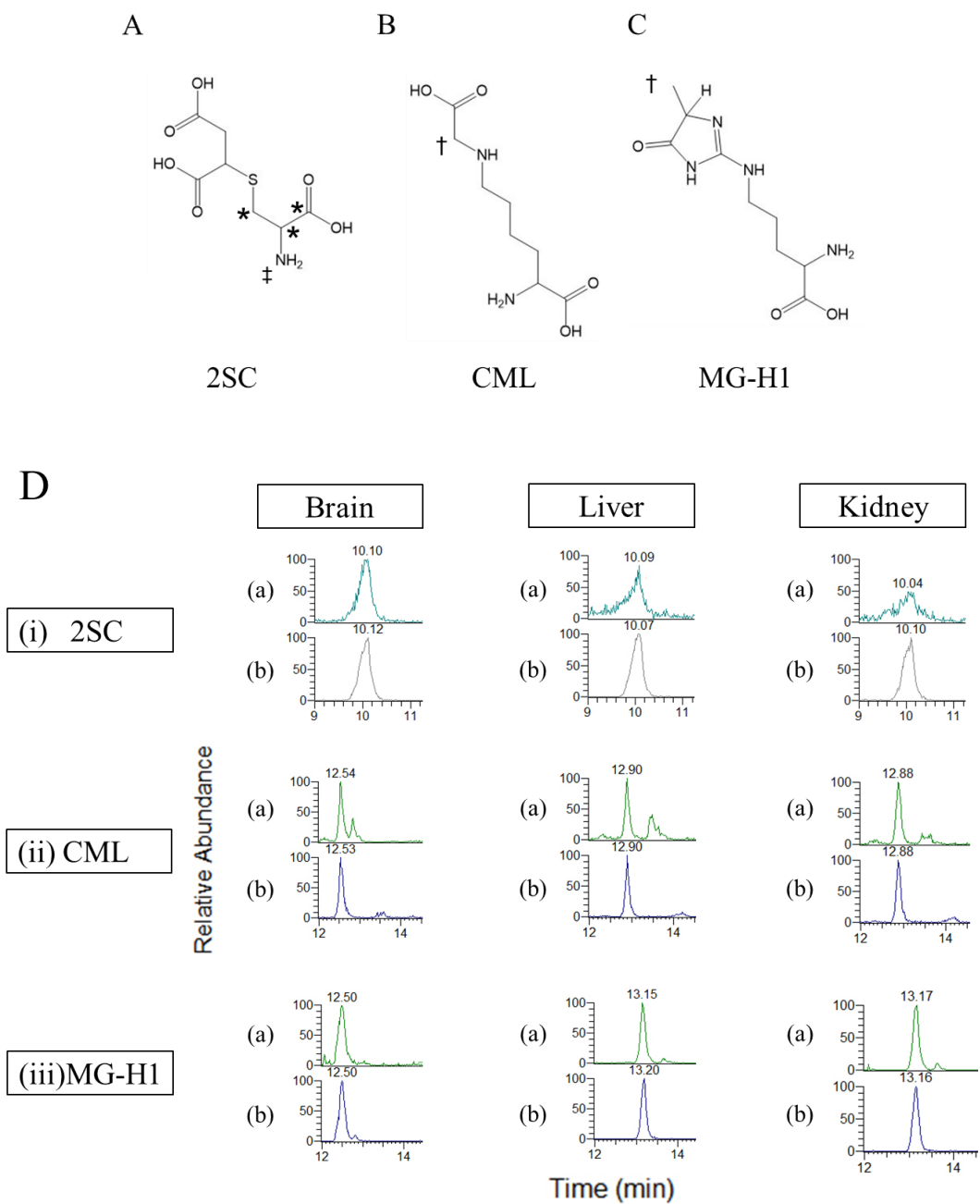


Fig. 5: 測定対象物の構造式およびクロマトグラム

(A) 2SC, (B) CML, (C) MG-H1 の構造式を示す。内部標準における炭素 13、重水素、窒素 15 にはそれぞれアスタリスク (*), ダガー (†), ダブルダガー (‡) を付記した。(D) 96 週齢のマウス組織において、(i) 2SC, (ii) CML, (iii) MG-H1 のフラグメントイオンのピークが検出された。(a) にはサンプル中の各 PTM のピーク、(b) には各内部標準のピークを表し、横軸に溶出時間 (min)、縦軸に相対存在量を示す。

2-5. 組織破碎液中フマル酸の測定

Fumarate Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて組織破碎液中のフマル酸を測定した。100 μL のバッファーにホモジナイズした組織サンプル 100 μL を加え混合した後、プロトコールに従い処理を行った。算出されたフマル酸濃度は、各組織のタンパク質濃度で正規化した。

2-6. 統計解析

測定データの描画には、ウェブアプリの PlotsOfData を使用した⁽⁴⁹⁾。すべてのデータは jitter プロットで表し、中央値を横線で示した。統計的検定は、Steel-Dwass 検定による一元配置分散分析 (Kruskal-Wallis 検定) を用いて行った。p 値 <0.05 を有意とした。すべての統計解析は R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いて行った⁽⁵⁰⁾。

3. 結果

3-1. 加齢に伴う組織中 2SC の変動

加齢に伴い生体内に蓄積する 2SC 量を評価する目的で、4, 12, 96 週齢の C57BL/6J マウスの組織中 2SC 値を LC-MS/MS で測定した。システインとシスチンは酸化還元状態で相互変換され、システインによる正規化では測定値が安定せず誤差が大きいため、2SC 量は Lysine 量で正規化した^(6,7)。2SC と [¹³C₃, ¹⁵N₁] 2SC (50 pmol) の典型的なフラグメントイオンクロマトグラムを Fig. 5D の (i) に示す。

剖検前の体重は、4, 12, 96 週齢のマウスでそれぞれ 18.2 ± 0.7 、 24.8 ± 1.3 、 32.7 ± 0.9 (g, 平均 \pm 標準偏差 [standard deviation: SD]) だった。2SC 値は、脳において週齢依存的に有意に増加した (Fig. 6A) ($p < 0.05$)。肝臓では、12 週齢と比較して 96 週齢で 2SC 値の有意な増加が観察された (Fig. 6B) ($p < 0.05$)。腎臓では、週齢による 2SC 値の変化は認められなかった (Fig. 6C)。血清中のタンパク質結合型 2SC は、検出限界以下であった (data no shown)。

各組織における 2SC 含量の違いを評価するために、Fig. 6A-C に示した 2SC 含量をタンパク質量でも正規化し、組織間の 2SC 値 (pmol/ μ g protein) を比較した。その結果、脳中 2SC 値は、いずれの週齢においても肝臓や腎臓より有意に高いことが明らかになった (Fig. 6D-F) ($p < 0.05$)。

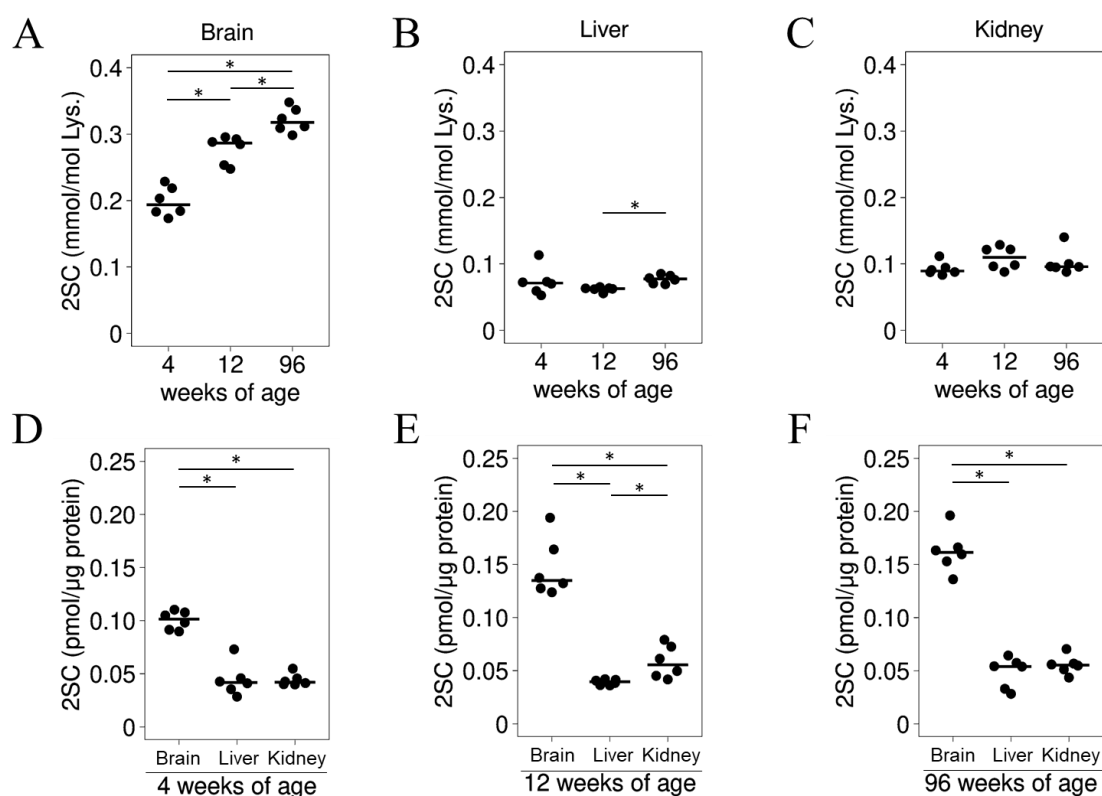


Fig. 6: 週齢による組織中 2SC 値の変化

(A) 脳、(B) 肝臓、(C) 腎臓の 2SC 値を LC-MS/MS で測定し、各組織の Lysine 含量で正規化した。4, 12, 96 週齢の 2SC 含有量の比較を示す。また、組織間の Lysine 含量の違いを考慮し、各週齢の組織における 2SC 量もタンパク質 100 μg で正規化した。(D) 4、(E) 12、(F) 96 週齢の 2SC 量を LC-MS/MS で測定し、各組織のタンパク質量で正規化した。脳、肝臓、腎臓における 2SC 含有量の比較を示す。データは jitter プロットで表し、中央値を横線で示した ($n = 6$, $*p < 0.05$)。

3-2. 加齢に伴う組織中 AGEs の変動

加齢に伴い生体内に蓄積する AGEs 量进行评估するために、4, 12, 96 週齢の C57BL/6J マウスの組織中 CML および MG-H1 値を LC-MS/MS により測定した。2SC、CML、MG-H1 の分母を揃えるために、Arginine 由来の AGE である MG-H1 値も Lysine で正規化し比較した。CML、 $[^2\text{H}_2]$ CML (10 pmol)、MG-H1、 $[^2\text{H}_3]$ MG-H1 (10 pmol) の典型的なフラグメントイオンクロマトグラムを Fig. 5D の (ii) および (iii) に示す。脳中 CML 値は加齢に伴い有意に増加した (Fig. 7A) ($p < 0.05$) のに対し、脳中 MG-H1 値は変化しなかった (Fig. 7D)。肝臓中 CML および MG-H1 値は、週齢依存的な変化は認められなかった (Fig. 7B, E)。腎臓では、両 AGEs の濃度は加齢とともに有意に増加した (Fig. 7C, F) ($p < 0.05$)。

加齢に伴う AGEs 値の変化をタンパク質で正規化 (pmol/ μg protein) しても、Lysine で正規化した場合と同様であった (Fig. 8)。血清中のタンパク質結合型 CML と MG-H1 値におい

では、加齢に伴う変化は認められなかった (data not shown)。

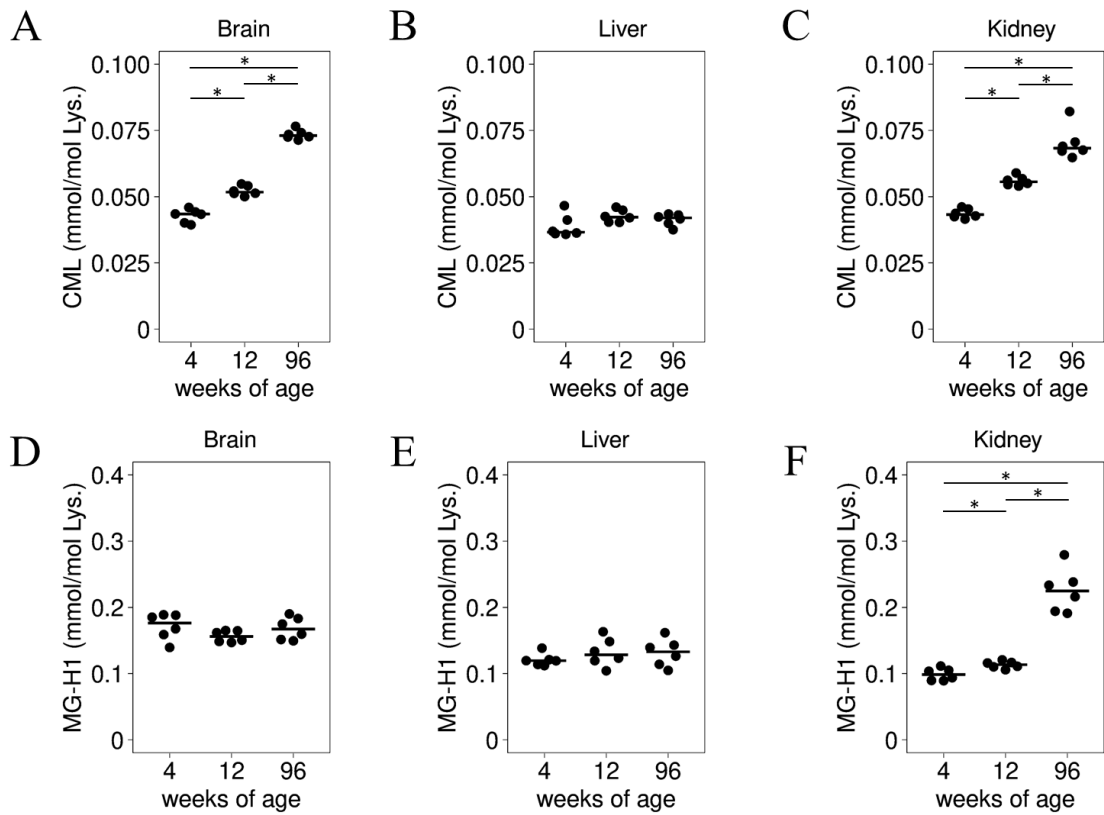


Fig. 7: 週齢による組織中 AGEs 値の変化

(A) 脳、(B) 肝臓、(C) 腎臓の CML 値を LC-MS/MS で測定し、各組織の Lysine 含量で正規化した。4, 12, 96 週齢の CML 含有量の比較を示す。(D) 脳、(E) 肝臓、(F) 腎臓の MG-H1 量を LC-MS/MS で測定し、各組織の Lysine 含量で正規化した。4, 12, 96 週齢の MG-H1 含有量の比較を示す。データは jitter プロットで表し、中央値を横線で示した ($n = 6$, $*p < 0.05$)。

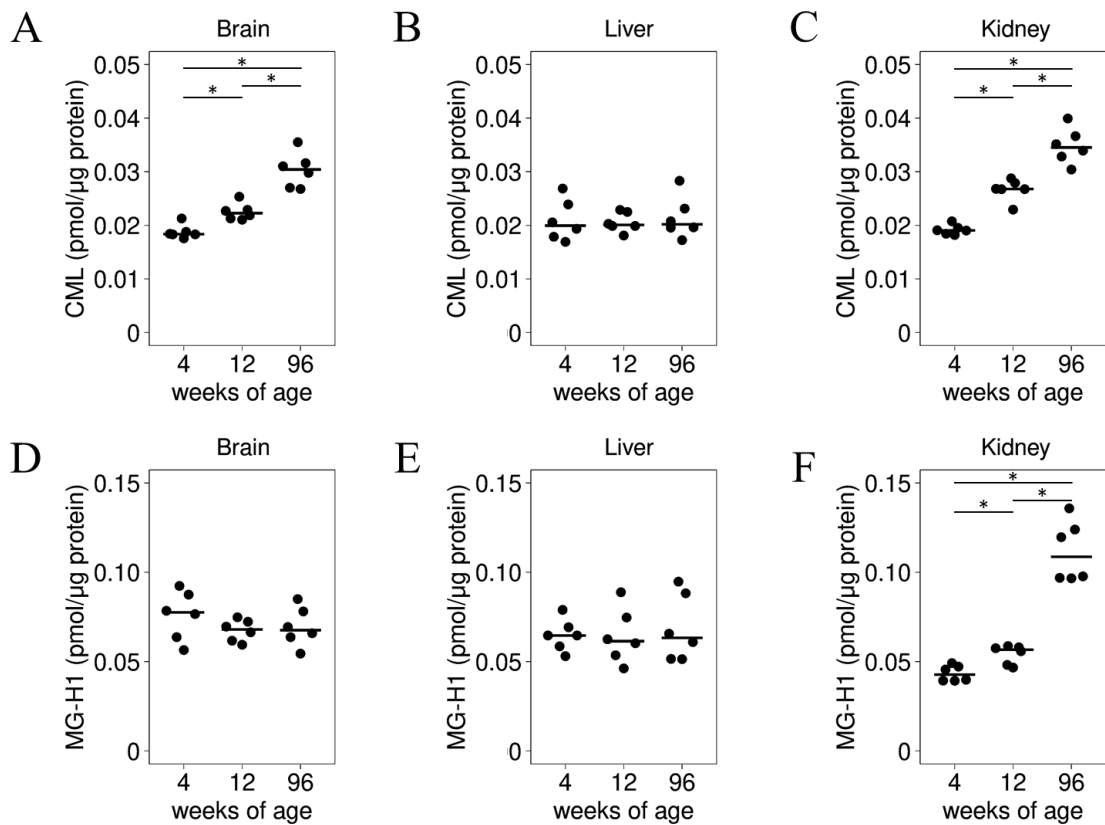


Fig. 8: タンパク質量で正規化した AGEs 値の変化

(A) 脳、(B) 肝臓、(C) 腎臓の CML 値を LC-MS/MS で測定し、各組織のタンパク質量で正規化した。また、(D) 脳、(E) 肝臓、(F) 腎臓の MG-H1 量を LC-MS/MS で測定し、各組織のタンパク質量で正規化した。全て 4, 12, 96 週齢の AGEs 含有量の比較を示す。データは jitter プロットで表し、中央値を横線で示した ($n = 6$, $*p < 0.05$)。

3-3. 加齢に伴う組織中フマル酸の変動

4, 12, 96 週齢の C57BL/6J マウスの組織中フマル酸濃度を Fumarate Assay Kit で測定した。4 および 12 週齢の脳中フマル酸量は、肝臓および腎臓と同様であった。さらに、96 週齢では肝臓と腎臓でフマル酸量が有意に増加したが、脳では変化が認められなかった (Fig. 9A-C) ($p < 0.05$)。

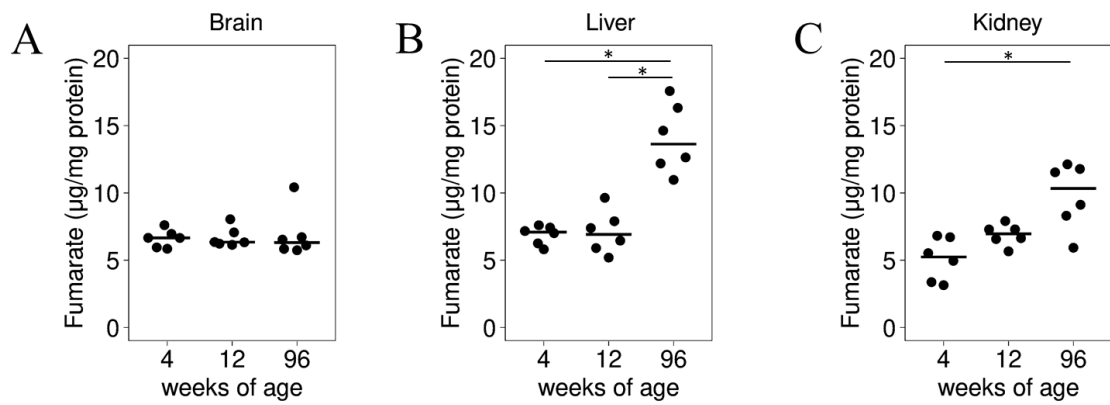


Fig. 9: 週齢による組織中フマル酸値の変化

(A) 脳、(B) 肝臓、(C) 腎臓のフマル酸量を Fumarate Assay Kit で測定し、各組織のタンパク質量で正規化した。4, 12, 96 週齢のフマル酸含有量の比較を示す。データは jitter プロットで表し、中央値を横線で示した (n = 6, * $p < 0.05$)。

4. 考察

Schaum ら (2020) によると C57BL/6JN マウスの寿命の中央値は 27 ヶ月であり、マウスの 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ヶ月齢はそれぞれ 13, 20, 30, 36, 43, 50, 56, 63, 69, 75 歳のヒトに相当する⁽⁵¹⁾。本研究では、少年期、青年期、高齢期にあたる 4, 12, 96 週齢 (1, 3, 24 ヶ月齢) での 2SC およびフマル酸、AGEs 値を測定した。LC-MS/MS 分析により、2SC はマウスの脳、肝臓、腎臓などの臓器に蓄積していることが明らかになったが、加齢による増加は脳でのみ観察された。各マウスの全脳重量は測定していないが、ホモジナイズ後のタンパク質濃度とサンプル液量から算出した 4, 12, 96 週目の半脳タンパク質量はそれぞれ 25.2 ± 3.4 , 29.3 ± 1.4 , 29.4 ± 5.3 (mg, 平均 \pm SD) であり、タンパク質量は 12 週目にプラトーに達していると考えられる。さらに、脳中 2SC 値は週齢依存的に増加したが (Fig. 6A)、肝臓 (Fig. 6B) および腎臓 (Fig. 6C) の含有量は週齢と無関係であった。よって、脳中 2SC の増加は単に体重の増加を反映しているのではないと考えられた。

糖尿病のように、グルコースが細胞のエネルギー必要量を超えて供給されると、ATP/アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate: ADP) 比が上昇し、ATP 合成酵素活性の阻害、ミトコンドリア膜電位の上昇が起こり、フィードバック機構により電子輸送が阻害される^(20, 52)。さらに還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (reduced nicotinamide adenine dinucleotide: NADH)/酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (oxidized nicotinamide adenine dinucleotide: NAD⁺) 比の増加によって、NAD⁺ 依存性脱水素酵素が阻害され細胞内のフマル酸濃度が増加する。Frizzell ら (2012) は、NADH/NAD⁺ 比の増加が培養脂肪細胞における 2SC 生成を促進すると報告している⁽⁵²⁾。齧歯類の脳、肝臓、腎臓等の臓器では加齢に伴い NADH/NAD⁺ 比が増加することから⁽⁵³⁻⁵⁵⁾、年齢による NADH/NAD⁺ 比の増加が NAD⁺ 依存性脱水素酵素の阻害と細胞内のフマル酸濃度増加を引き起こし、2SC 蓄積を増加させると考えられる。

Cabré ら (2017) の報告によると、ヒト脳の前頭葉における 2SC 値は、40 歳と 90 歳の間では差がなかった⁽⁴⁵⁾。López-González ら (2015) も同様に、4~40 週齢の P301S 変異ヒトタウ遺伝子導入マウスと野生型マウスの体性感覚皮質、海馬、脊髄における 2SC 蓄積量に有意な差がないことを報告している⁽⁴³⁾。先行研究の結果と今回の結果の相違は、測定対象の年齢の違いが理由の一つに挙げられる。López-González らのマウスは最大で 40 週齢であり、本研究のマウスより比較的若かったが、今回の研究では 96 週齢までの脳中 2SC 値の変動を測定した。脳の 2SC 濃度は、肝臓や腎臓と比較して 2~3 倍高値であった。脳は、グルコースを全身の約 25%、酸素を約 20% 消費し、大量のエネルギーを消費することが知られている⁽⁵⁶⁾。そのため、加齢に伴うミトコンドリア機能の異常を受けやすく⁽⁵⁷⁾、結果として 2SC の蓄積が増加したと考えられる。

Frizzell ら (2009) は、糖尿病マウスの精巣上体脂肪組織中の 2SC 含量は飼育期間に応じて増加するが、フマル酸含量は 15 週以降に減少すると報告した⁽⁷⁾。さらに、高血糖状態で形成された脂肪細胞中の 2SC-protein は、その後、脂肪細胞を正常な血糖状態に戻すと低下することが報告されている⁽⁵²⁾。以上のことから、脳内に多量の 2SC が蓄積することは、フ

マル酸の含有量が多いからではなく、除去能力が低いためである可能性も考えられた。加齢に伴い脳内のシステイン含量が増加するかを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。また、脳内には 2SC 化の報告がある Tubulin が多く存在することも、脳中 2SC 値が高いことと関連している可能性がある⁽⁵⁸⁾。2SC はカルボキシル基の脱プロトンにより負イオンになりやすく、主鎖の正イオン電荷を 2SC が打ち消すかたちになるため、正イオンモードでの修飾ペプチドの検出は技術的に困難であると考えられる。したがって、脳内には検出されていない 2SC 修飾タンパク質がさらに存在すると推測される。

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化の副産物として活性酸素種を生成する。加齢に伴う酸化ストレス制御機能の欠陥は、ミトコンドリア DNA を損傷してミトコンドリアの機能障害を引き起こし、さらに酸化ストレスを増大させて悪循環を作り出す⁽⁵⁹⁾。脳や腎臓はミトコンドリア量や組織重量あたりの酸素消費量が高く、酸化ストレスを受けやすいと言われている^(56, 60)。したがって、CML 濃度は加齢に伴い上昇する可能性がある。

MG を無毒化する glyoxalase 1 (GLO1) ノックアウトマウスをピリドキサミン欠乏飼料で飼育した場合の脳中 MG 含量は正常マウスより高い⁽⁶¹⁾。本研究では、加齢に伴い脳中 2SC 値が増加したが (Fig. 6A)、MG-H1 値は増加しなかった (Fig. 7D)。この結果は、脳内タンパク質が GLO1 によって MG による修飾から保護されている可能性を示す。さらにグルタチオンは抗酸化物質および GLO1 の補酵素として働き肝臓に豊富に存在するため、肝臓は加齢に伴う AGEs 値の増加から高度に保護されている可能性がある。加齢に伴う脳中 2SC 値の増加は Slc:SD ラットでも認められ (data not shown)、異なる種でも 2SC が加齢依存的に増加することが示唆された。

5. 小括

以上の結果から、蓄積する PTM 産物は組織毎に異なり、それは前駆体や酸化ストレスによる生成と除去のバランスの影響を受けることが示唆された。特に脳においては 2SC および CML 値が、肝臓においては 2SC 値、腎臓においては CML と MG-H1 が加齢に伴い増加することが明らかとなり、各組織の機能低下に関与する可能性がある。今後、組織の各部位における 2SC・AGEs の含有量の違いや、PTM 産物形成と機能障害との関係を明らかにすることで、その役割がより明確になると期待される。

今回は齧歯類を用いた研究成果であるが、本研究では 2SC の新たな測定方法や加齢に伴う変化と succination との関連が示された。今後はヒトも含めて 2SC 研究を進めることによって、生体における succination の更なる寄与が明らかになると考えられる。

第2章 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動

1. 背景

1-1. 腎臓の位置と構造⁽⁶²⁻⁶⁴⁾

腎臓は腰のやや上部、背中側に左右1個ずつ存在する。形状はそら豆様で、長径は成人で12 cm 程度、1個当たり約120~150 g である。一对の腎臓はそれぞれ、機能単位である約100万個ものネフロンで構成されている。ネフロンは、糸球体という毛細血管の塊とそれを包み込むボウマン嚢をあわせた腎小体、そこから延びる尿細管から成る。さらに腎臓には、血液が流れる腎動脈と腎静脈の他、腎臓で産生された尿が膀胱まで移行するための尿管が繋がっている (Fig. 10)。

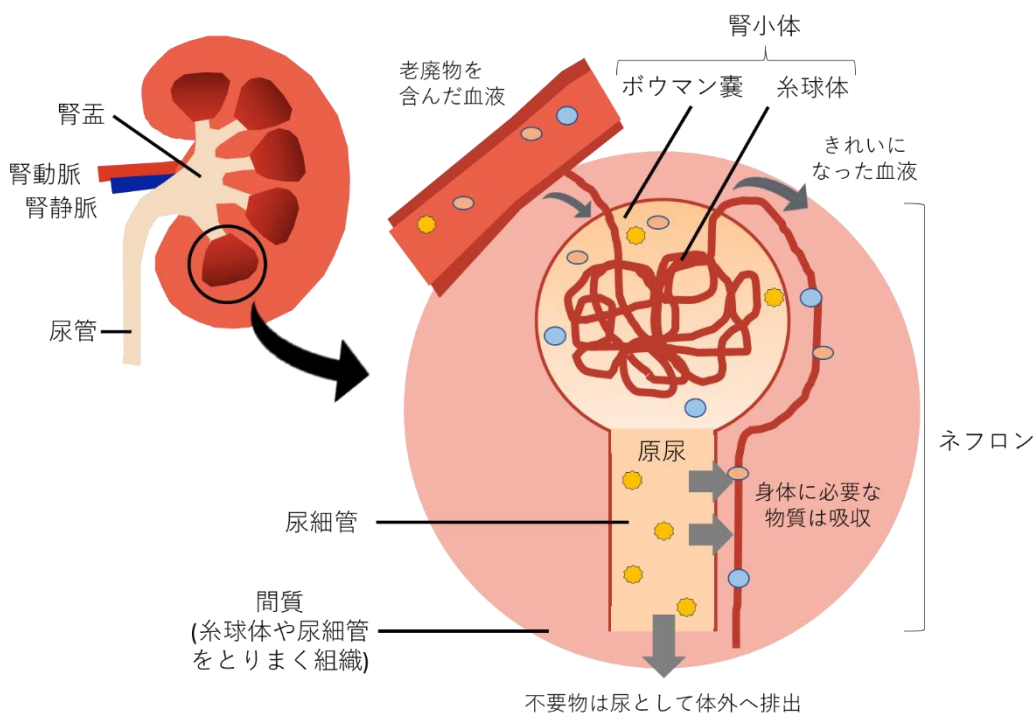


Fig. 10: 腎臓の構造

1-2. 腎臓の働き^(62, 63)

腎臓の主な機能は①血液中の毒素や老廃物を取り出して尿として排出することであり、他に②水分量や電解質、体液の pH、血圧の制御、③ホルモン合成等を担っている。

①代謝の過程で生成された毒素や老廃物は、血流にのって腎臓に集められ、フィルターである糸球体で濾過され水分と共に原尿となる。この時、血球やほとんどのタンパク質は糸球体を通過しない。しかし、原尿にはブドウ糖や電解質等の身体に必要な物質も含まれているため、尿細管を通る間に再吸収され、老廃物等が尿として体外に排出される。原尿は1日に約150L生成されるが、その99%は再吸収され、残り1%の約1.5Lが尿として排泄される。

②腎臓は、①のような仕組みによって水分量や電解質の調節を行っている。また、水素イ







オン (H⁺) の尿への排出を調節し、体内の pH を弱アルカリ性 (pH 7.40 ± 0.05) に保っている。さらに、レニンやカリクレイン等の酵素を分泌し、血圧制御の一端を担う。

③赤血球は骨髄中の造血幹細胞によって産生されるが、それを制御する造血ホルモンであるエリスロポエチンは腎臓から分泌される。よって、腎機能低下はエリスロポエチン産生量の低下を引き起こし、腎性貧血の原因となる。また、肝臓に蓄積したビタミン D は腎臓に移行して活性型ビタミン D となる。これは腸管からのカルシウム吸収を促進する働きがあるため、腎機能が低下するとカルシウムの吸収が悪くなり、骨粗鬆症などの原因になる。

1-3. 腎機能低下とその診断

何らかの原因で腎臓が障害され、その機能が低下する疾患を腎臓病と呼び、数時間から数日の内に急激に腎機能が低下する「急性腎障害 (acute kidney injury: AKI)」と、慢性的に進行するすべての腎臓病を指す「慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD)」に大別される。CKD の定義は、①尿異常、画像診断、血液、病理で腎障害の存在が明らか (特に 0.15 g/g クレアチニン以上の蛋白尿 [30 mg/g クレアチニン以上のアルブミン尿] の存在が重要)、②糸球体濾過量 (glomerular filtration rate: GFR) が 60 mL/min/1.73 m² 未満、のいずれか、または両方が 3 ヶ月以上持続することである⁽⁶⁵⁾。GFR の国際標準測定法はイヌリンクリアランス測定だが、煩雑かつ高額なため、日常診療では血清クレアチニン値に基づく日本人の GFR 推算式を用いて推算糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) として評価する⁽⁶⁶⁾。CKD の重症度は原疾患 (Cause)、腎機能 (GFR)、蛋白尿・アルブミン尿 (Albuminuria) に基づく CGA 分類によって評価される (Table. 2)⁽⁶⁵⁾。

Table. 2: 腎機能の評価

						
GFR区分	G1	G2	G3a	G3b	G4	G5
GFR (mL/min/1.73 m ²)	≥90	60~89	45~59	30~44	15~29	<15
腎機能	正常または 高値	正常または 軽度低下	軽度~ 中等度 低下	中等度~ 高度低下	高度低下	末期腎不全 (ESRD)

CKD の重症度を評価する CGA 分類の内、腎機能 (GFR) について図示した。GFR が 60 mL/min/1.73 m² 未満、つまり G3a~G5 の状態か明らかな腎障害の状態が 3 ヶ月以上持続すれば CKD と診断される。『エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018』における「表 1. CGA 分類」を改変し作成した。

1-4. CKD 増悪による末期腎不全への進展および治療方法

GFR が 15 未満の末期腎不全 (end-stage renal disease: ESRD) まで進行すると人工透析や腎移植が必要となる。処置をせずに放置すると尿毒症を発症し、初期には倦怠感や不眠、食欲不振、頭痛、嘔吐等の様々な症状が現れ、さらに進行すると心不全や昏睡状態を引き起こし、死に至る可能性がある。また、eGFR が低下するごとに死亡率や心血管疾患の発症率が有意に増加するという報告があることから、腎機能は心血管疾患の発症や生命予後に多大な影響を与えることが示唆されており、「心腎連関」の概念が提唱されている⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾。

人工透析は腎臓の代わりに老廃物や余分な水分を除去する治療で、血液を透析器 (ダイアライザー) に通す「血液透析」と、腹腔内に高糖濃度の透析液を注入・貯留させ浸透圧を利用し腹膜を介して処置を行う「腹膜透析」の 2 種類がある。しかし、ホルモンの合成や血圧の制御等の役割を担うことはできない上、不均衡症候群や腹膜炎等の合併症を発症する可能性がある。血液透析は週 3 回程度通院しなければならず、治療 1 回に 4 時間程度を要する。また、腹膜透析の場合は 1 日に 4 回程度のバッグ交換が必要であり、いずれの場合も日常生活が制限される^(70, 71)。

腎移植は他者の腎臓を移植することで腎機能を回復させる、ESRD 唯一の根治療法である。脳死あるいは心停止の方からいただく「献腎 (死体) 腎移植」と、原則として親族間で行われる「生体腎移植」があるが、死後腎提供が少ない日本では生体腎移植がほぼ 90% を占めている⁽⁷²⁾。腎臓の提供者は「ドナー」、腎臓移植を受ける患者は「レシピエント」と呼ばれる。日本において腎ドナーは慢性的に不足しているため、高齢、高血圧、肥満、軽度な糖尿病、のように標準的ドナー条件を満たさないドナー (マージナルドナー) からの腎移植も行われているのが現状である⁽⁷³⁾。腎移植は透析と比較して生命予後が良く、食事や飲水等の制限が少なく QOL も向上するが、移植腎の拒絶反応を抑えるために免疫抑制薬を一生飲み続ける必要がある。また、移植腎の機能が低下し、透析再導入となってしまうこともある。なお、透析療法を経ることなく腎移植を行う場合があり、これを先行的腎移植 (Pre-emptive kidney transplantation: PEKT) と言う。

1-5. 世界および日本における腎臓病の現状

緒言の Fig. 1 に示した通り、WHO の報告によると腎臓病による死亡者数は 2000 年の 81 万 3,000 人から 2019 年には 130 万人に増加し、世界の主要な死因の 10 位となっている⁽⁴⁾。また、GBD Chronic Kidney Disease Collaboration によっても、1990 年から 2017 年までに世界の全年齢慢性腎臓病有病率は 29.3% 増加したことが報告されている⁽⁷⁴⁾。

本邦において、CKD 患者数は約 1,330 万人と推計され、成人の約 8 人に 1 人は CKD である⁽⁶⁵⁾。透析療法を受けている患者数は年々増加傾向であり、有病率を示す人口 100 万人あたりの透析患者数は 2020 年には 2,754.3 人で、これは国民 363.1 人に 1 人が透析患者であることになる⁽⁷³⁾。また、新型コロナウイルス感染症パンデミックの影響で 2020 年は前年より減少したものの、2011 年から 10 年間で腎移植実施数は徐々に増加している⁽⁷²⁾。

1-6. 腎臓およびCKDとAGEsの関連

腎臓が排出する尿毒素には AGEs やその前駆体が含まれるため、腎機能が低下すると AGEs が腎臓に蓄積することになる。それが CKD の進展や透析導入を早めることが示唆されている⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾。また、糖尿病細小血管合併症のひとつに糖尿病性腎臓病が含まれることから、腎臓と AGEs に関しては多くの研究がなされている。

1-7. 腎臓とミトコンドリアの関連

腎臓は酸素消費量と組織重量あたりのミトコンドリア量が心臓に次いで 2 番目に高い^(60, 78, 79)。腎臓の機能のために必要なエネルギー産生のほとんどはミトコンドリアでの代謝に依存している⁽⁷⁹⁾。よって、ミトコンドリアの異常は腎機能に多大な影響を与える可能性がある⁽⁸⁰⁻⁸²⁾。

コハク酸やフマル酸は TCA 回路中間体として働くのみならず、がん細胞において α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ酵素群の活性を競合的に阻害することで DNA およびヒストンのメチル化の亢進や低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor-1 α : HIF-1 α) を安定化し、がん化に関与することが明らかになっている⁽⁸³⁾。フマル酸ヒドラターゼ (Fumarate hydratase: FH) をコードする遺伝子に変異が認められる遺伝性平滑筋腫症腎細胞癌 (hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: HLRCC) の腫瘍や FH1 欠損マウスの腎嚢胞においては、フマル酸の産生が増大し、クエン酸とイソクエン酸間の変換を触媒する Aconitase2 が修飾され活性が阻害されることが報告されている^(84, 85)。

1-8. 血中代謝物測定の意義

血中代謝物は病態の発症や進行に伴って変動し、組織における異常を反映する。一般的に、肝障害の診断項目としてはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotransferase: AST) やアルブミン、脂質代謝異常では総コレステロール値やトリグリセリド、高比重リポタンパク質 (High-density lipoprotein: HDL) コレステロール値、低比重リポタンパク質 (Low-density lipoprotein: LDL) コレステロール値、糖質代謝異常では血糖値、ヘモグロビン A1c (HbA1c) が測定される。なお、HbA1c は赤血球に含まれるヘモグロビン β 鎖 N 末端のバリン残基にグルコースが結合したアマドリ化合物である。

腎機能の代表的なマーカーとしては、前述した通り血清クレアチニン値が用いられる。クレアチニンは、筋肉で ATP を再合成する際にクレアチンリン酸が代謝されて産生された後、老廃物として尿中に排出される。よって、血中クレアチニン値が高いということは腎臓の濾過能 (腎機能) が低下していることを意味する。しかし、クレアチニン値は筋肉量に比例して高値を示すため、性別の影響を受けたり、高齢者の場合は腎疾患がなくとも腎機能が低く見積もられるという問題点がある。したがって、血清クレアチニン値に加えて年齢、性別の違いを考慮した計算式を用いて eGFR 値を算出する。この他に尿素窒素、尿酸、尿蛋白/クレアチニン比等が腎機能評価に用いられることがある。

腎臓は、肝臓や膵臓と共に「沈黙の臓器」と呼ばれることがあり、CKDが無自覚のまま発症・進行するケースが多い。ESRDまで進行しても腎代替療法により長期生存は可能だが、前述したように心血管疾患発症リスクの上昇や合併症発症、QOL低下、移植腎不足、医療費の増加等の様々なデメリットがあり、やはりCKD発症の予防と早期発見、治療介入による重症化の防止が重要である。

血中における非酵素的なPTMの測定は代謝異常や病態発症の進行度を評価するバイオマーカーになると考えられる。実際に、血中のグルコース濃度に比例して形成されるHbA1cは一度の食事による影響を受けず、過去1~2ヵ月の血糖値を反映することから、糖尿病の診断や治療の際のバイオマーカーとして世界中の臨床現場で使用されている。さらに、血中AGEsの測定によって糖尿病合併症の進行も評価できる可能性があり、研究が進められている。AGEsと同様、2SCであれば安定して血中から検出され、フマル酸や乳酸等の有機酸測定では困難な、病態の発症や進行に伴うミトコンドリア代謝の変動を評価できると期待される。また、2SCの測定は病態の発症・進行メカニズムの解明にも寄与すると考えられるが、病態に伴う血中2SCの変動について検討した報告は乏しい。

本研究では、液体サンプル中2SCを測定するための前処理方法を確立し、LC-MS/MSを用いて腎移植患者血清中2SCおよびAGEsの変動を評価し、2SCと比較するために前駆体であるフマル酸も測定した。さらに、定量値を用いて複数の解析を行うことで、血中2SC測定の有用性について検討した。

2. 実験方法

2-1. サンプル

本研究では、東海大学付属病院の腎移植外来に定期的に通院をしている、腎機能が正常な生体腎ドナーと外来患者 26 名および腎移植患者 153 名の内、同意が得られた健常者 26 名と患者 110 名を対象とした。被験者は 2020 年 6 月 12 日から 2022 年 6 月 30 日までの間に登録された。

研究対象者は、血清クレアチニン値から eGFR への日本人向け方程式を用い、CKD ステージ 2, 3a, 3b, 4, 5 に分類した⁽⁶⁶⁾。eGFR は、以下の式を用いて算出した：

$$194 \times \text{血清クレアチニン値}^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287} \text{ (女性の場合は} \times 0.739 \text{)}$$

正常腎被験者 26 名の内、副甲状腺疾患あるいは前立腺肥大症である 4 名が対象から除外された。また、健常群には Stage 3a の腎ドナーが含まれていたが、高齢が原因であると考えられたため腎機能は正常とみなされた。腎移植群では、中止基準に該当する患者はおらず、同意が得られた 110 名全員が対象となった。本研究の対象者の選抜および解析手順のフローチャートを Fig. 11 に示す。

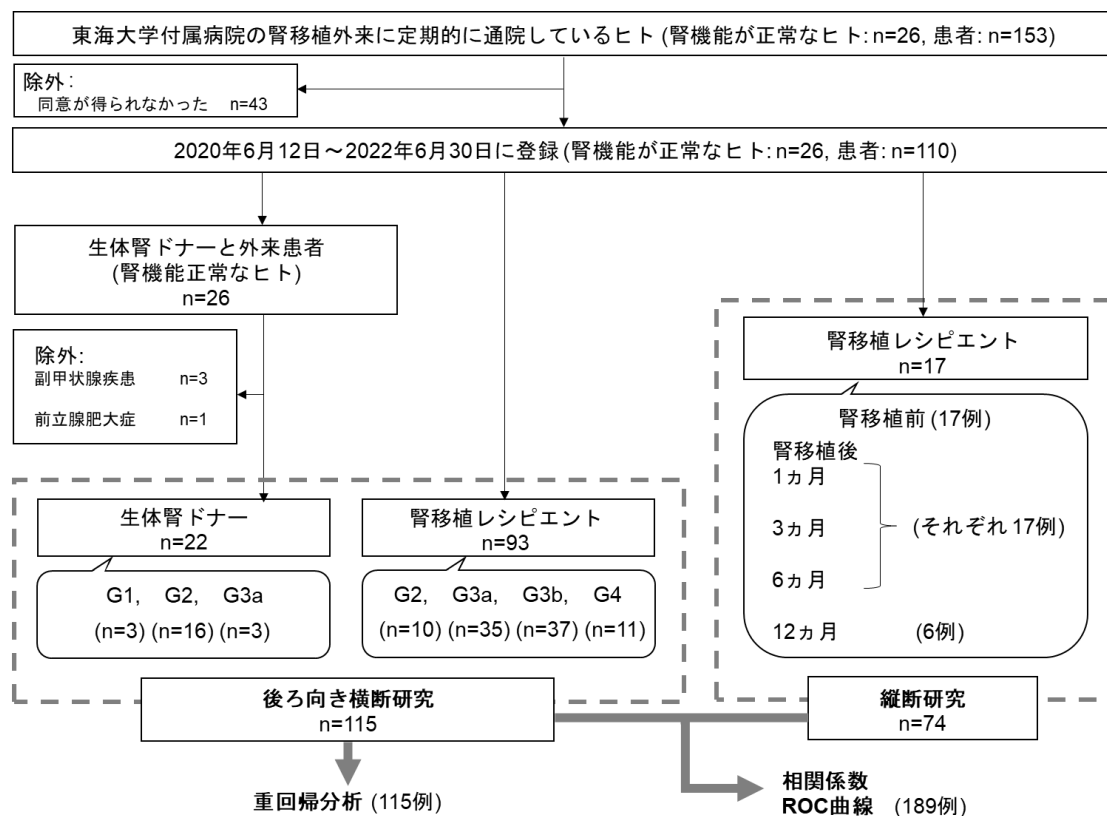


Fig. 11: 研究対象者の選抜および解析手順のフローチャート

血液は6時間絶食後に採取された。全血は室温(25°C)で1時間静置し、3000×g、20°C、15分の遠心分離を行い、血清を採取した。臨床データは病院の臨床検査部で測定され、残りの血清は使用するまで-80°Cで保管した。ボディマス指数(body mass index: BMI)を算出するために被験者の身長と体重を測定した。HDLコレステロール値は後ろ向き横断研究腎移植患者群94検体の内7検体分欠損していたため、以下の式を用いて算出HDLコレステロール値も計算した。

$$(\text{総コレステロール}) - (\text{LDLコレステロール値}) - (\text{トリグリセリド}/5)$$

ただし、1検体のみ総コレステロール値が欠損しており算出できなかった。また、以下の式を用いてBrinkman指数を算出した:

$$(1 \text{ 日当たりの喫煙本数}) \times (\text{喫煙年数})$$

本研究は、東海大学「人を対象とする研究」に関する倫理委員会の承認(承認番号21064)を受け、ヘルシンキ宣言の原則に準拠している。研究を開始する前に、各患者に研究計画を説明し書面によるインフォームド・コンセントを得た。

2-2. 後ろ向き横断研究

腎機能の違いによる血清中代謝物の変化を明らかにするために、健常群として生体腎ドナー22名と腎移植を行った患者93名を対象に実験を行った。末期腎不全の原因をTable 3に示した。

データセットには、3つのCKDステージ(G1=3, G2=16, G3a=3)の22名の健常者と、4つのCKDステージ(G2=10, G3a=35, G3b=37, G4=11)の93名の腎移植後患者が含まれた。患者らは、腎移植から平均48.7ヵ月(SD:33.2, 中央値:43, 最短:1.5, 最長:109.3)後に採血を受けた。血清中の遊離型2SCおよびAGEsをLC-MS/MSで測定し、血清中のフマル酸をキットで測定した。

なお、腎機能での違いを分かりやすくするために健常群と腎移植患者群の2群間で臨床データをまとめ、血中代謝物の比較も実施した。

Table 3: 末期腎不全の原因

	患者数	割合 (%)
【後ろ向き横断研究】	(計) 93	
IgA ^a 腎症	20	22
糖尿病性腎症	16	17
多発性嚢胞腎	12	13
慢性糸球体腎炎	10	11
腎硬化症	8	9
低形成腎	3	3
巣状分節性糸球体硬化症	2	2
ループス腎炎	2	2
ANCA ^b 関連腎炎	2	2
間質性腎炎	2	2
その他	7	8
不明	9	10
【縦断研究】	(計) 17	
腎硬化症	5	29
糖尿病性腎症	4	24
慢性糸球体腎炎	3	18
間質性腎炎	3	18
不明	2	12

^aIgA, Immunoglobulin A (免疫グロブリン A); ^bANCA, Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (抗好中球細胞質抗体).

その他には、慢性腎盂腎炎、溶連菌感染後急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerulonephritis: RPGN)、リポ蛋白糸球体症、膀胱尿管逆流 (vesicoureteral reflux: VUR)、シクロスポリン (cyclosporine: CsA) 腎症、抗糸球体基底膜 (glomerular basement membrane: GBM) 抗体型腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis: MPGN) がそれぞれ1例ずつ含まれる。

2-3. 縦断研究

腎移植による血清中代謝物の変動を明らかにするために、継続的に採血が可能だった全17名の末期腎不全患者を対象として実験を行った。末期腎不全の原因を Table 3 に示した。腎移植前および移植後1, 3, 6ヵ月 (6名のみ12ヵ月目にも実施) 時点での血清中遊離型2SC および CML、MG-H1 の測定を LC-MS/MS を用いて行った。フマル酸はキットを用いて測定した。

2-4. 遊離型 2SC 値測定のための血清の前処理

2SC の同位体標識および非標識標準品は第 1 章 2-2. と同様の方法で入手した。ヒト血清 (30 μ L) と内部標準として 5 μ L の 10 μ M [$^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_1$] 2SC、水 660 μ L を、2.1 mL の 0.1% (v/v) ギ酸含有メタノールが入った Captiva ND^{Lipids} cartridge (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に添加し、溶出させた。その画分を吹付け式試験管濃縮装置 (MG-2200; Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) によって乾固し、1% (v/v) ギ酸含有水 1 mL で再溶解した。その溶液を、メタノール 1 mL で予洗し、1% (v/v) ギ酸含有水 3 mL で平衡化した Sep-Pak C18 3 cc Vac Cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA) に通した。さらに、2 mL の 1% (v/v) ギ酸含有 20% (v/v) メタノールを溶出させ、得られた計 3 mL の画分を乾固した。それを 20% (v/v) アセトニトリルおよび 0.1% (v/v) ギ酸を含む水 1 mL で再溶解し、VIVASPIN 500 filter (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) でフィルター濾過した。

2-5. 遊離型 AGEs 値測定のための血清の前処理

CML と MG-H1 の同位体標識および非標識標準品は、第 1 章 2-3. と同様の方法で入手した。ヒト血清の前処理は以前記載された方法に基づいて行った⁽⁴⁸⁾。70 μ L の水と 70 μ L のヒト血清を混合し、VIVASPIN 500 フィルターに通して濾液 50 μ L を得た。そこにサンプルと等量 (50 μ L) の 100 mM sodium borate buffer (pH 9.1) と、10 分の 1 量 (5 μ L) の 2 M 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4 , FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 0.1 M 水酸化ナトリウム (NaOH , FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 水溶液を添加し、25°C で 4 時間静置し還元処理を行った。内部標準として 1 μ M の [$^2\text{H}_2$] CML (10 μ L) と 1 μ M [$^2\text{H}_3$] MG-H1 10 μ L、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: TFA) 含有水 800 μ L をサンプルに加え混合した。1 mL メタノールで予洗し、1 mL の 0.1% (v/v) TFA 含有水で平衡化した Strata-X-C column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) にサンプルを通し、2% (v/v) ギ酸含有水 3 mL で洗浄した後、7% (v/v) アンモニア含有水 2 mL で溶出させた。計 2 mL の溶出画分を乾固し、20% (v/v) アセトニトリルおよび 0.1% (v/v) ギ酸を含む水 1 mL で再溶解、0.45 μ m フィルター (Syringe-driven Filter Unit Millex-LH; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で濾過した。

2-6. LC-MS/MS による 2SC および AGEs の測定

第 1 章 2-4. と同様に行った。2SC および CML、MG-H1 の溶出時間は 9–14 min だった。

2SC 値は測定に用いた血清量 (30 μ L) で、AGEs (CML および MG-H1) 値は VIVASPIN 500 フィルター処理の濾液量 (50 μ L) で標準化した。

2-7. 血清中フマル酸の測定

血清中フマル酸はフマル酸アッセイキット (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い、プロトコールに則って測定を行った。フマル酸含量は実験に用いた血清量 (50 μ L) で正規化した。

2-8. 統計解析

対象者の臨床データに関して、カテゴリー変数はサンプルサイズ (割合) で表し、フィッシャーの正確確率検定あるいはカイ二乗検定で比較した。連続変数は中央値 (25%パーセンタイル-75%パーセンタイル) で表し、マンホイットニーの U 検定で比較した。血中代謝物の値は箱ひげ図で表し、マンホイットニーの U 検定あるいはスティーアの多重比較検定、ボンフェローニ補正マンホイットニーの U 検定で群間の比較を行った。

相関係数は、横断研究および縦断研究の結果 (全 189 例) を用いて Spearman ノンパラメトリック法により分析した。

また、血中代謝物の値による腎機能低下の判別精度を評価するために、横断および縦断研究で得られた全 189 例の定量値を基に受信者動作特性曲線 (Receiver operating characteristic curve: ROC 曲線) を作成した。ROC 曲線は横軸に 1-特異度 (偽陽性率)、縦軸に感度 (陽性率) をプロットして線で結んで表すグラフである。その線がグラフの左上方に位置し、曲線下面積 (area under the curve: AUC) が 1 に近いほど検査の精度が高いことを表す。本研究では、健常群および Stage 2 の腎移植患者データを陰性 (n=38)、Stage 3a から 5 までの腎移植患者データを陽性 (n=151) に分類して解析を行った。

2SC 値に影響を及ぼす変数を明らかにするために、横断研究のデータ 115 例を用いて重回帰分析を行った。2SC 値を従属変数、先行研究を基に選択した年齢、性別、BMI、血清クレアチニン値、hemoglobin A1c (HbA1c)、Brinkman 指数を独立変数とした^(7, 86, 87)。

全ての統計解析および図と表の作成は、Microsoft Excel 2019 と R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR version 1.54 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った⁽⁵⁰⁾。 p 値 <0.05 を統計的に有意とみなした。

3. 結果

3-1. 後ろ向き横断研究: 健常群および腎移植を行った患者の血中代謝物の比較

Fig. 12 に示すように、LC-MS/MS により 2SC、CML、MG-H1 のピークが明瞭に検出された。健常群と、腎機能のステージ毎に分類した腎移植患者群の臨床データを Table 4 に示した。2SC および CML、MG-H1 値は腎機能低下に伴い有意に増加したが (Fig. 13A, C, D)、フマル酸値は変動しなかった (Fig. 13B)。

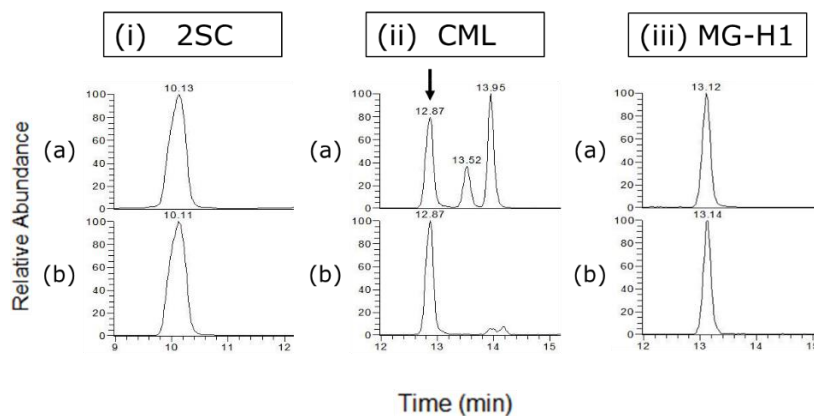


Fig. 12: 測定対象のクロマトグラム

腎移植前の CKD ステージ 5 患者血清より検出された (i) 2SC、(ii) CML (矢印で示したピーク)、(iii) MG-H1 の典型的なフラグメントイオンクロマトグラムを示す。(a) には血清中の各 PTM のピーク、(b) には各内部標準のピークを表し、横軸に溶出時間 (min)、縦軸に相対存在量を示した。

Table 4: 健常群およびCKDステージ毎に分類した腎移植患者群の臨床データ

	Living kidney donors as normal subjects (n=22)		Kidney transplantation patients (n=93)			
	G2 (n=10)	G3a (n=35)	G3b (n=37)	G4 (n=11)		
Age (years)	59.0 (53.0-65.8)	47.5 (37.0-59.8)	48.0 (39.5-57.0)	49.0 (42.0-60.0)	53.0 (41.5-69.0)	
Men	4 (18%)	8 (80%)	20 (57%)	26 (70%)	6 (55%)	
Height (cm)	159.6 (155.8-164.3)	166.6 (163.3-170.6)	165.8 (156.2-170.7)	166.9 (158.5-174.0)	162.1 (157.0-169.6)	
Body weight (kg)	58.4 (55.9-63.0)	55.8 (52.0-63.2)	63.0 (50.9-69.3)	66.0 (53.1-76.3)	62.8 (47.3-68.1)	
BMI ^a (kg/m ²)	22.65 (21.73-24.35)	21.55 (18.39-22.38)	22.20 (19.85-25.15)	22.70 (19.60-25.30)	23.10 (18.55-24.70)	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	12.5 (12.0-14.8)	15.5 (14.0-17.0)	16.0 (13.5-20.0)	21.0 (18.0-22.0)	29.0 (25.0-36.0)	
Serum creatinine (mg/dL)	0.675 (0.583-0.768)	0.945 (0.853-1.060)	1.120 (1.045-1.305)	1.560 (1.270-1.700)	2.180 (1.470-2.555)	
Uric acid (mg/dL)	4.45 (4.20-5.48)	5.75 (5.08-6.28)	5.70 (5.10-6.25)	5.70 (5.30-6.70)	6.20 (6.05-7.15)	
eGFR ^b (mL/min/1.73 m ²)	75.0 (68.3-81.0)	64.0 (61.0-68.8)	49.0 (47.0-53.5)	38.0 (35.0-41.0)	25.0 (24.5-27.5)	
Urine protein/creatinine ratio (g/g)	NA	0.095 (0.060-0.310)	0.150 (0.060-0.360)	0.200 (0.070-0.360)	0.170 (0.115-0.685)	
PEKT ^c	NA	2 (20%)	17 (49%)	12 (32%)	3 (27%)	
Duration of dialysis (years)	NA	2.2 (0.2-4.1)	0.1 (0-2.2)	0.3 (0-1.7)	1.0 (0.1-1.6)	
Donor age (years)	NA	49.5 (39.3-54.0)	58.0 (53.5-63.0)	61.0 (56.0-70.0)	68.0 (62.0-71.5)	
Blood sugar (mg/dL)	93.5 (89.0-100.0)	98.0 (90.0-103.0)	98.0 (90.5-105.5)	98.0 (91.0-108.0)	100.0 (98.0-111.5)	
Hemoglobin A1c (%)	5.6 (5.3-6.0)	5.7 (5.5-5.8)	5.9 (5.6-6.2)	5.9 (5.6-6.2)	5.8 (5.7-6.7)	
Hemoglobin (g/dL)	14.4 (13.2-14.7)	13.4 (12.8-14.4)	13.7 (12.7-15.3)	12.8 (11.3-13.6)	10.7 (10.0-11.6)	
Diabetes mellitus	0 (0%)	2 (20%)	4 (11%)	7 (19%)	3 (27%)	
Total Cholesterol (mg/dL)	213.5 (204.5-248.5)	203.0 (192.0-224.0)	206.5 (190.3-225.8)	206.0 (192.0-220.0)	194.0 (168.5-205.0)	
Triglyceride (mg/dL)	90.5 (69.3-153.0)	102.0 (74.0-131.3)	128.0 (90.5-179.0)	131.0 (79.0-173.0)	143.0 (89.0-166.5)	
HDL ^d -cholesterol (mg/dL)	66.5 (54.3-82.8)	72.0 (70.0-80.0)	67.0 (54.0-78.0)	67.0 (52.8-90.3)	66.0 (58.7-79.8)	
Calculated HDL ^d -cholesterol (mg/dL)	63.2 (50.4-79.3)	76.2 (57.8-78.9)	59.8 (49.0-73.6)	66.2 (52.4-86.6)	61.2 (54.6-75.3)	
LDL ^e -cholesterol (mg/dL)	135.5 (123.0-157.0)	107.0 (94.8-122.5)	115.0 (99.5-125.5)	114.0 (96.0-128.0)	97.0 (75.0-108.5)	
AST ^f (U/L)	21.0 (19.0-23.8)	22.5 (21.3-28.3)	22.0 (18.5-26.0)	20.0 (18.0-27.0)	20.0 (16.5-23.0)	
Albumin (g/dL)	4.3 (4.2-4.5)	4.2 (4.0-4.5)	4.3 (4.0-4.5)	4.2 (4.1-4.5)	4.1 (4.0-4.4)	
Current smoking	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (5%)	0 (0%)	
Smoking history	7 (32%)	6 (60%)	17 (49%)	18 (49%)	4 (36%)	
Brinkman index	0 (0-131)	170 (0-385)	0 (0-300)	3 (0-360)	0 (0-101)	

データは n (%) あるいは中央値 (25%パーセンタイル-75%パーセンタイル) で表した。

^aBMI, Body mass index; ^beGFR, estimated Glomerular Filtration Rate; ^cPEKT, Pre-emptive kidney transplantation; ^dHDL, High-density lipoprotein; ^eLDL, Low-density lipoprotein; ^fAST, Aspartate aminotransferase.

NA, 該当なし

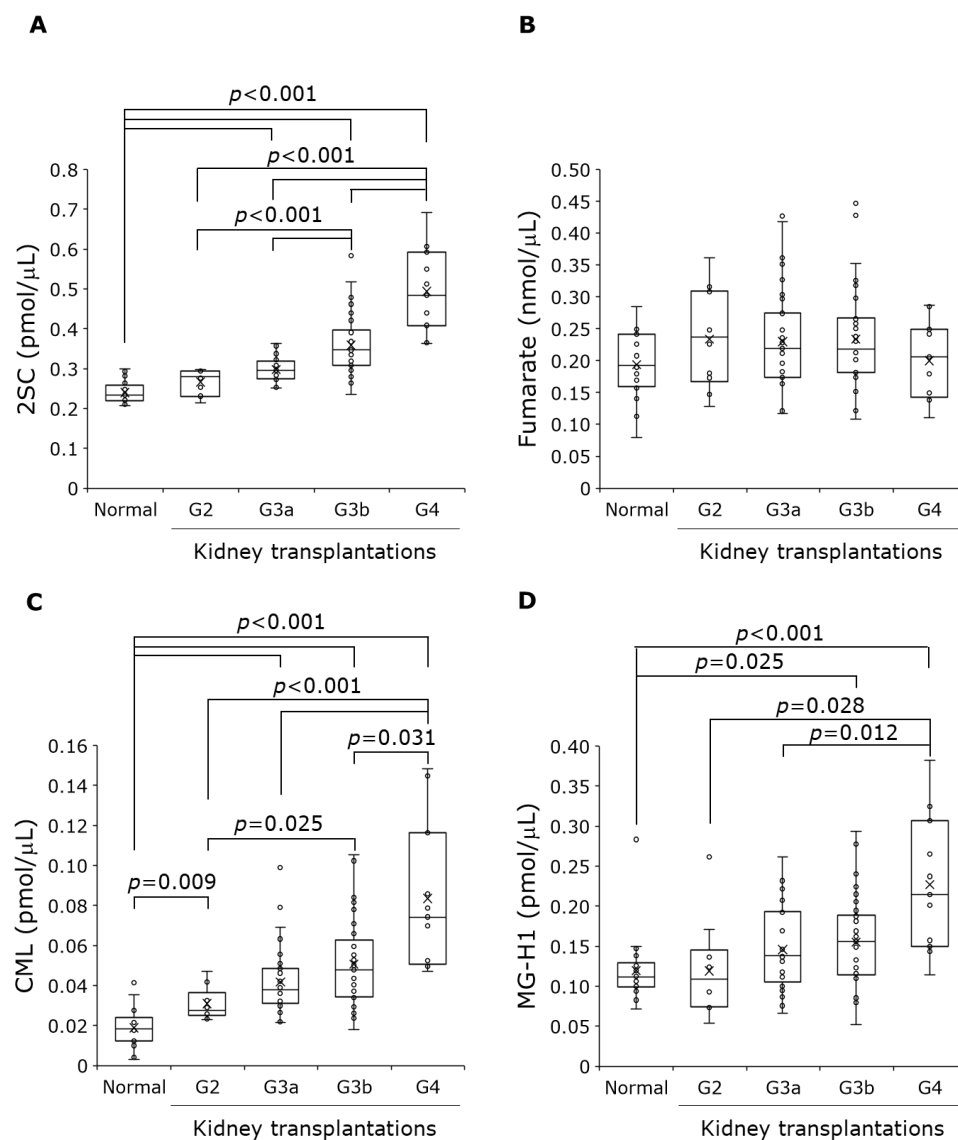


Fig. 13: 後ろ向き横断研究：健常群および腎移植を行った患者のCKDステージ別での血清中代謝物の比較

実験方法に記載したように、(A) 2SC および (B) fumarate, (C) CML, (D) MG-H1 値は測定に用いたサンプル量で正規化した。データは箱ひげ図、平均値はクロス (×) で表した。健常群 (n=22) および G2 (n=10), G3a (n=35), G3b (n=37), G4 (n=11) 間の比較はボンフェローニ補正マンホイットニーの U 検定を用いて解析し、*p* 値をグラフに示した。

腎機能の指標である尿素窒素、血清クレアチニン、尿酸、eGFR等の項目において、健常群と腎移植患者群で有意な差が検出された (Table 5)。健常群と比較して腎移植患者群における 2SC および CML、MG-H1 は有意に高値を示した (Fig. 14A, C, D) (それぞれ $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.004$)。しかしながら、フマル酸に関しては有意な差は検出されなかった (Fig. 14B) ($p=0.078$)。

Table 5: 健常群および腎移植を行った患者群での臨床データの比較

	Living kidney donors as normal subjects (n=22)	Kidney transplantation patients (n=93)	<i>p</i>
Age (years)	59.0 (53.0-65.8)	49.0 (41.0-60.0)	0.00396
Men	4 (18%)	60 (65%)	<0.001
Height (cm)	159.6 (155.8-164.3)	166.4 (158.3-172.0)	0.0135
Body weight (kg)	58.4 (55.9-63.0)	63.0 (50.2-71.5)	0.357
BMI ^a (kg/m ²)	22.65 (21.73-24.35)	22.3 (19.30-25.20)	0.306
Blood urea nitrogen (mg/dL)	12.5 (12.0-14.8)	19.0 (16.0-22.0)	<0.001
Serum creatinine (mg/dL)	0.675 (0.583-0.768)	1.310 (1.070-1.610)	<0.001
Uric acid (mg/dL)	4.45 (4.20-5.48)	5.90 (5.30-6.40)	<0.001
eGFR ^b (mL/min/1.73 m ²)	75.0 (68.3-81.0)	44.0 (36.0-51.0)	<0.001
Urine protein/creatinine ratio (g/g)	NA	0.16 (0.06-0.36)	NA
PEKT ^c	NA	34 (37%)	NA
Duration of dialysis (years)	NA	0.5 (0-2.1)	NA
Donor age (years)	NA	59.0 (54.0-67.0)	NA
Blood sugar (mg/dL)	93.5 (89.0-100.0)	98.0 (91.0-108.0)	0.113
Hemoglobin A1c (%)	5.6 (5.3-6.0)	5.8 (5.6-6.3)	0.0108
Hemoglobin (g/dL)	14.4 (13.2-14.7)	12.9 (11.5-14.5)	0.046
Diabetes mellitus	0 (0%)	16 (17%)	0.0389
Total Cholesterol (mg/dL)	213.5 (204.5-248.5)	204.5 (189.8-220.5)	0.0151
Triglyceride (mg/dL)	90.5 (69.3-153.0)	128.0 (87.0-173.0)	0.125
HDL ^d -cholesterol (mg/dL)	66.5 (54.3-82.8)	68.0 (54.0-82.3)	0.642
Calculated HDL ^d -cholesterol (mg/dL)	63.2 (50.4-79.3)	63.6 (50.2-79.2)	0.918
LDL ^e -cholesterol (mg/dL)	135.5 (123.0-157.0)	112.0 (93.0-125.0)	<0.001
AST ^f (U/L)	21.0 (19.0-23.8)	21.0 (18.0-26.0)	0.701
Albumin (g/dL)	4.3 (4.2-4.5)	4.2 (4.0-4.5)	0.106
Current smoking	0 (0%)	3 (3%)	1
Smoking history	7 (32%)	45 (48%)	0.2436
Brinkman index	0 (0-131)	0 (0-300)	0.153

データは n (%) あるいは中央値 (25%パーセンタイル-75%パーセンタイル) で表す。

^aBMI, Body mass index; ^beGFR, estimated Glomerular Filtration Rate; ^cPEKT, Pre-emptive kidney transplantation; ^dHDL, High-density lipoprotein; ^eLDL, Low-density lipoprotein; ^fAST, Aspartate aminotransferase.

NA, 該当なし

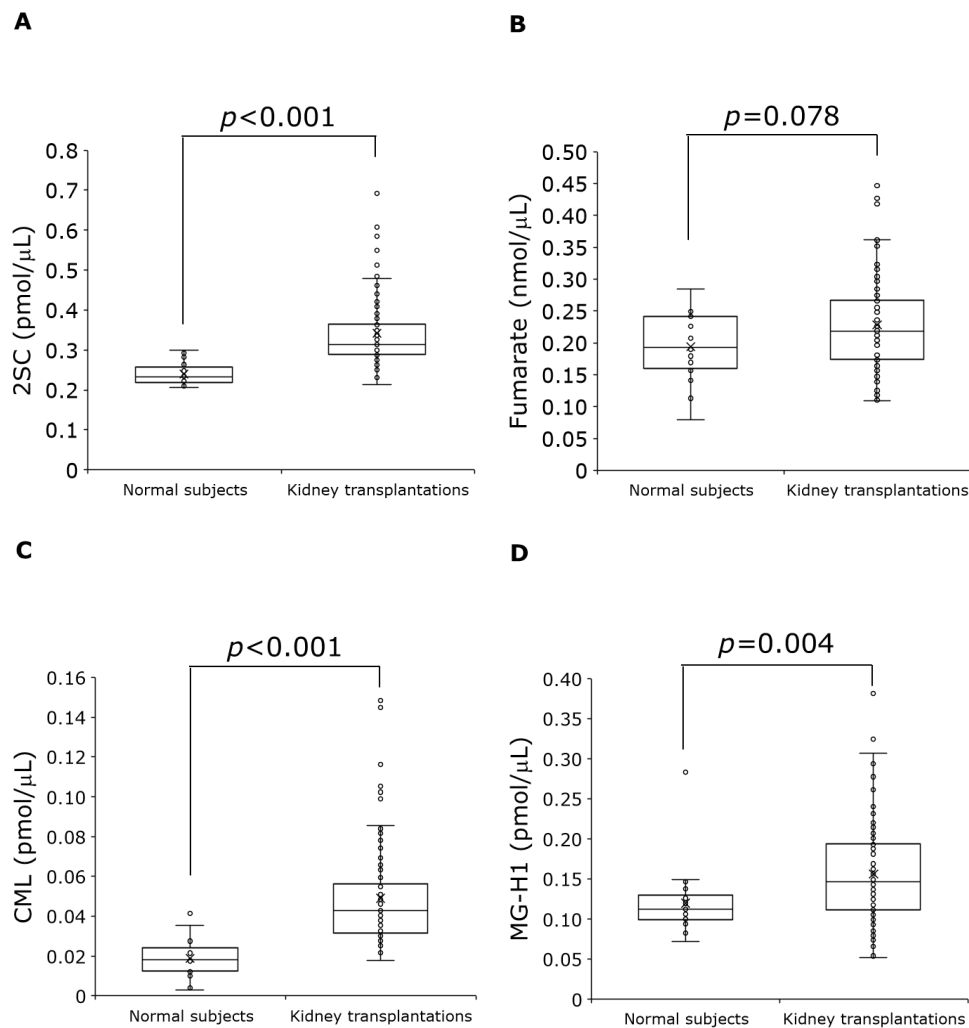


Fig. 14: 後ろ向き横断研究：健常群および腎移植を行った患者の血清中代謝物の比較
 血清中 (A) 2SC および (B) fumarate, (C) CML, (D) MG-H1 値は測定に用いたサンプル量で正規化した。データは箱ひげ図、平均値はクロス (×) で表した。健常群 (n=22) および腎移植患者群 (n=93) の比較はマンホイットニーの U 検定を用いて解析し、 p 値をグラフに示した。

3-2. 縦断研究：腎移植前後の血中代謝物の変化

対象者の主な臨床データを Table 6 に示す。2SC および CML、MG-H1 は腎移植後に有意に減少した (Fig. 15A, C, D) (それぞれ Before versus [vs.] After 1, 3, 6 months; $p < 0.001$, Before vs. After 12 months; $p = 0.001$)。一方、フマル酸値は腎移植前と比較して腎移植後 1 カ月 ($p = 0.009$), 3 カ月 ($p = 0.008$), 6 カ月 ($p = 0.001$) において有意に高値を示した。なお、血清クレアチニン値は 2SC や AGEs (CML, MG-H1) と同様に腎移植後に有意に低下し、それに伴って eGFR 値は有意に増加した (Fig. 15E, F) (それぞれ Before vs. After 1, 3, 6 months; $p < 0.001$, Before vs. After 12 months; $p = 0.001$)。

Table 6: レシピエントの腎移植前の臨床データ要約

	Kidney transplant recipients (n=17)
Age (years)	55.0 (38.0-59.0)
Men	7 (41%)
Height (cm)	163.5 (153.3-169.5)
Body weight (kg)	60.2 (48.3-66.0)
BMI ^a (kg/m ²)	21.4 (18.7-25.5)
Serum creatinine (mg/dL)	8.59 (6.41-10.50)
eGFR ^b (mL/min/1.73 m ²)	5.0 (4.0-6.0)
PEKT ^c	7 (41%)
Diabetes mellitus	4 (24%)
Current smoking	1 (6%)
Smoking history	7 (41%)
Brinkman index	0 (0-119)

データは n (%) あるいは中央値 (25%パーセンタイル-75%パーセンタイル) で表した。

^aBMI, Body mass index; ^beGFR, estimated Glomerular Filtration Rate; ^cPEKT, Pre-emptive kidney transplantation.

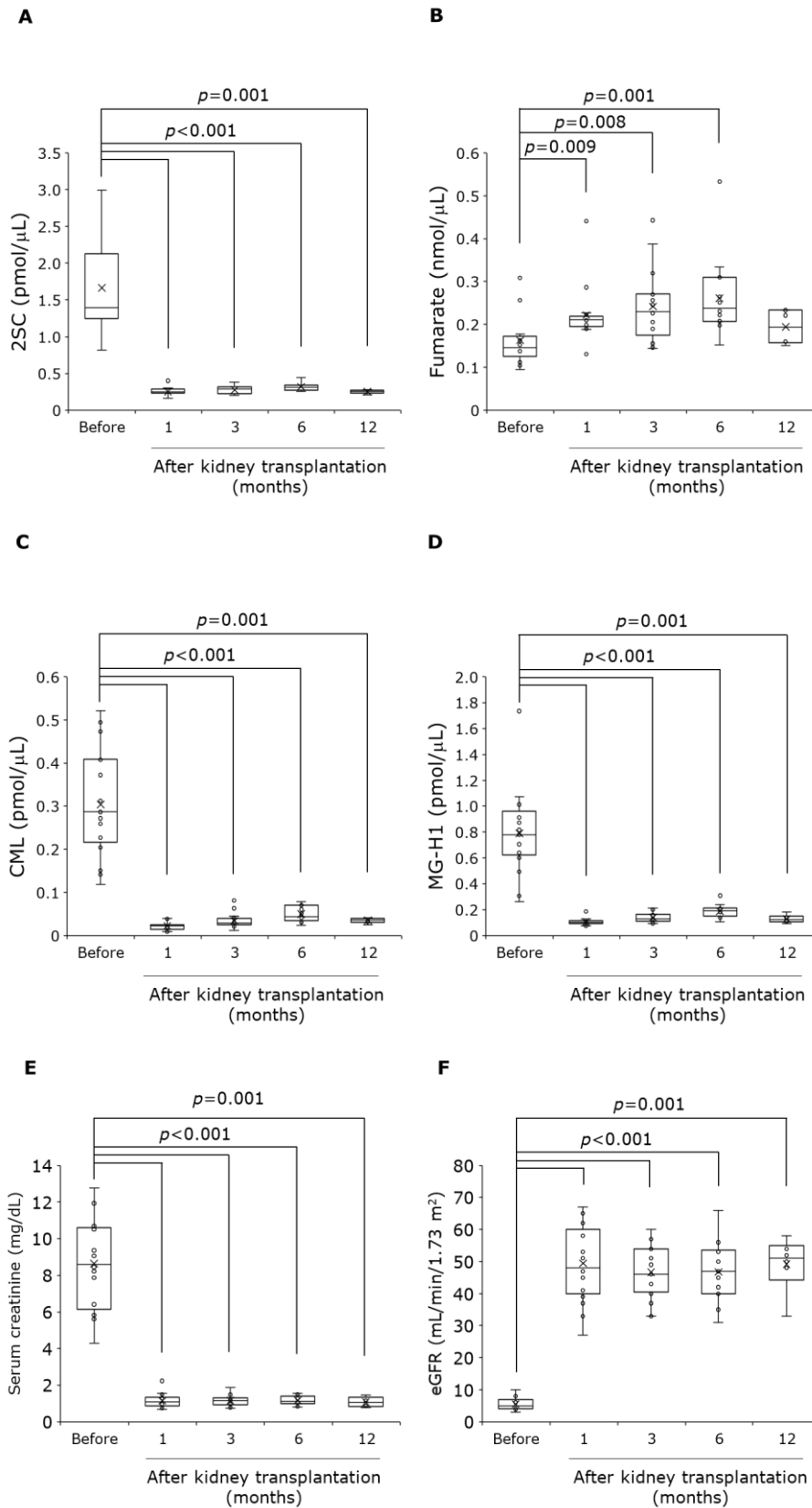


Fig. 15: 縦断研究: 腎移植前後での血清中代謝物の変化

血清中 (A) 2SC および (B) fumarate, (C) CML, (D) MG-H1 値は測定に用いたサンプル量で正

規化した。(E) 血清クレアチニン値は臨床検査部で測定し、(F) eGFR は年齢・性別・血清クレアチニン値に基づく計算式を用いて算出した。データは箱ひげ図、平均値はクロス (×) で表した。腎移植前の血清代謝物の値 (n=17) と、移植後 1 (n=17), 3 (n=17), 6 (n=17), 12 (n=6) カ月の比較はスティーラの多重比較検定を用いて解析し、*p* 値をグラフに示した。

3-3. 血中代謝物と既存の腎機能マーカーの相関関係

2SC と血中クレアチニン値は正の ($r_s=0.802, p<0.001$)、eGFR 値とは負の ($r_s=-0.818, p<0.001$) 強い相関を示した (Table 7)。

また、2SC は CML ($r_s=0.769, p<0.001$) および MG-H1 ($r_s=0.615, p<0.001$) とともに正の相関を示した。一方、フマル酸は他のいずれの項目とも相関を示さなかった。

さらに、CML ($r_s=0.685, p<0.001$) および MG-H1 ($r_s=0.532, p<0.001$) はそれぞれ、血清クレアチニン値との有意な正の相関を示した。一方、eGFR 値とは有意な負の相関を示すことが明らかになった (CML; $r_s=-0.702, p<0.001$) (MG-H1; $r_s=-0.580, p<0.001$)。

Table 7: 血清中代謝物と既存の CKD マーカーの相関関係

	Fumarate	CML	MG-H1	SCr	eGFR
	r_s	r_s	r_s	r_s	r_s
2SC	-0.037	0.769 ^{***}	0.615 ^{***}	0.802 ^{***}	-0.818 ^{***}
Fumarate	-	-0.137	-0.174 [*]	-0.110	0.117
CML	-	-	0.773	0.685 ^{***}	-0.702 ^{***}
MG-H1	-	-	-	0.532 ^{***}	-0.580 ^{***}
SCr	-	-	-	-	-0.883 ^{***}

SCr, Serum creatinine; eGFR, estimated Glomerular Filtration Rate; r_s , Spearman's rank correlation coefficient. ^{*}*p* < 0.05; ^{***}*p* < 0.001.

3-4. ROC 曲線

2SC の AUC は 0.871 (95% 信頼区間 [confidence interval: CI]: 0.817-0.925) だった (Fig. 16A)。フマル酸の AUC は 0.479 (95% CI: 0.380-0.578)、CML は 0.846 (95% CI: 0.783-0.909)、MG-H1 は 0.761 (95% CI: 0.681-0.841) だった (Fig. 16B, C, D)。

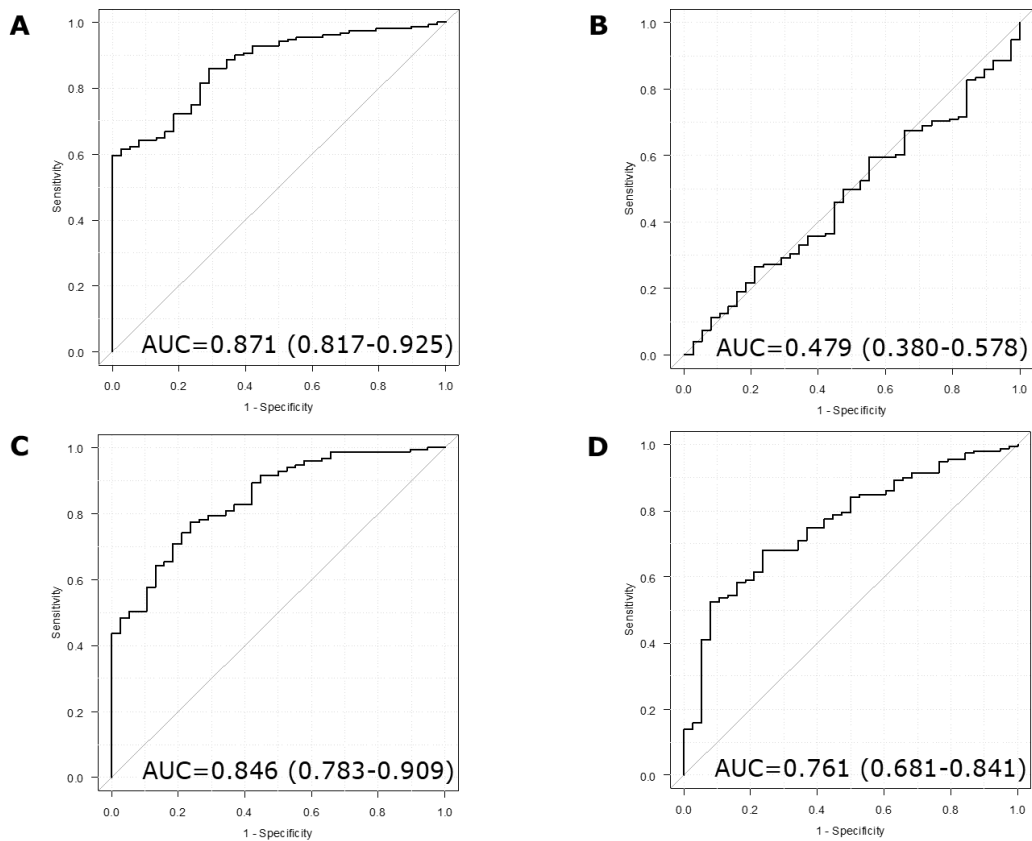


Fig. 16: 血清中代謝物のROC曲線

横断および縦断研究において得られた189例のデータから、(A) 2SC および (B) フマル酸、(C) CML、(D) MG-H1 値のROC曲線を作成した。グラフにAUCを示した。

3-5. 重回帰分析

年齢 ($\beta=0.205, p=0.002$)、性別 ($\beta=-0.192, p=0.010$)、血清クレアチニン値 ($\beta=0.918, p<0.001$) が2SC値に影響を与える因子だった ($R=0.676, \text{adjusted } R^2=0.658, p<0.001$) (Table 8)。分散拡大係数 (Variance inflation factor: VIF) はいずれの変数においても2未満だった。

Table 8: ヒト血清中2SC値に関する重回帰分析

変数	β	B	SE	t	p
年齢	0.205	0.00146	0.00046	3.190	0.002
性別	-0.192	-0.03502	0.01333	-2.627	0.010
BMI (kg/m ²)	-0.033	-0.00075	0.00135	-0.559	0.577
血清クレアチニン値 (mg/dL)	0.918	0.17325	0.01335	12.973	<0.001
HbA1c (%)	0.090	0.01074	0.00745	1.440	0.153
Brinkman指数	0.021	0.00001	0.00002	0.332	0.741

$R=0.676, \text{adjusted } R^2=0.658, p<0.001$.

β , standardized partial regression coefficient (標準化偏回帰係数); B, partial regression coefficient (偏回帰係数); SE, standard error (標準誤差); BMI, body mass index (ボディマス指数); HbA1c,

hemoglobin A1c (ヘモグロビン A1c).

4. 考察

2SC の増加はミトコンドリアストレスに伴うフマル酸の増大によるものとされ、加齢⁽⁴²⁾や2型糖尿病⁽⁷⁾、がん⁽⁸⁵⁾、肥満に伴う高血糖⁽⁸⁶⁾、呼吸器疾患⁽⁸⁷⁾等の疾患との関連が報告されている。

本研究において、2SC 値は腎機能の低下に伴い有意に増加 (Fig. 13A) し、腎移植によって有意に低下した (Fig. 15A)。また、2SC 値は既存の腎機能マーカーである血清クレアチニン値および eGFR 値と強い相関を示し (Table 7)、腎機能低下を評価するための有望な指標となることが示唆された (Fig. 16A)。重回帰分析によって、ヒト血清中遊離型 2SC 値は年齢および性別、血清クレアチニン値の影響を受ける因子であることが示された (Table 8)。腎機能を決定する eGFR 値は、血清クレアチニン値を基に筋肉量を考慮した年齢と性別で補正して算出されるため、2SC が腎機能低下に伴い増加するという結論と本結果に矛盾はないと考えられる。

CKD において、ミトコンドリア機能および TCA 回路を構成する有機酸が関与することは以前から指摘されている⁽⁸⁸⁾。糖尿病性腎症モデルである *db/db* マウスの、6 週齢での血清中あるいは腎皮質において、2SC 前駆体でもあるフマル酸は、コントロール群と比較して有意に高値を示した^(89,90)。また、非糖尿病性腎臓病患者においては TCA 回路での代謝が顕著に影響を受けており、血中フマル酸は健常群と比較して有意に高値であることが報告されている⁽⁹¹⁾。しかしながら本研究では、健常群および腎移植患者ステージ 2, 3a, 3b, 4 群間でフマル酸濃度の有意な差は検出されなかった (Fig. 13B)。そのため、2SC や AGEs、既知の腎機能マーカーのいずれとも相関関係は認められず (Table 7)、腎機能マーカーとしての精度は低かった (Fig. 16B)。この原因として、仮にフマル酸が増加しても直ちに他の構造に代謝されてしまうこと、あるいは succination によってフマル酸が消費されることが考えられた。前述したように CKD でフマル酸が増加するという報告とは対照的に、アデニン誘発性 CKD マウスの腎組織中フマル酸はコントロールと比較して有意に低いという報告もあり、他の TCA 回路代謝物と同様、その調節は動的なものであると指摘されている^(88, 92)。移植前で腎機能ステージ 5 時点の血中フマル酸値は、腎移植後でステージ 2~4 に改善された時と比較して有意に低かった (Fig. 15B)。これは末期腎不全の段階では TCA 回路の機能が著しく低下しているためと考えられる。以上より、フマル酸は腎機能が顕著に悪化しなければ血中での変動が検出されず、マーカーとしては不十分であると結論づけられた。

一般的に、ミトコンドリア機能を評価するためには筋生検や、尿や血液における有機酸検査が行われるが、筋生検は侵襲性が高く、患者にとっての負担は大きい。また、乳酸などの有機酸値は変動しやすく、マーカーとしては不十分であるとの指摘もある^(93,94)。血中 2SC 値の日内変動や、その他如何なる疾患が 2SC 生成の亢進と関連するか等、未だ明らかになっていない点も多いが、2SC 測定は筋生検と比べて侵襲性が低く、腎機能やミトコンドリアの機能異常を評価する一次スクリーニング検査として有意義であると考えられる。臨床分野において病態との関連を明らかにするのみならず、細胞培養の培地や実験動物の血液サンプル中 2SC を測定することで、ミトコンドリアストレスを評価する等の応用も期待でき

る。しかし、病態に伴うヒト血中 2SC の変動について明らかにした報告は一報のみである⁽⁸⁷⁾。この論文をはじめ、生体中 2SC の測定には多くの場合 GC-MS が用いられているが、その場合は 2SC を測定するための複数の誘導体化処理が必要である^(6,7)。本研究では固相抽出カラム等を用いて夾雑物除去の処理を行うことで、血清中 2SC を誘導体化なしに LC-MS/MS で検出する手法を確立した。

血中から 2SC が検出される理由としては、腎機能低下に伴い腎臓において産生が増大したフマル酸が腎組織を修飾し、2SC が産生され、それが血中に放出されたためと考えられる。高グルコース条件で培養された近位尿細管細胞 (HK-2) からの培地中 nicotinamide mononucleotide (NMN) 濃度および NAD⁺/NADH 比は、通常のグルコース条件培養と比較して有意に低値を示す (NADH/NAD⁺比が増加)、という報告がある⁽⁹⁵⁾。Frizzell らは高血糖状態の脂肪細胞において NADH/NAD⁺比が増加し、NAD⁺依存性脱水素酵素の阻害が細胞内のフマル酸濃度増加とタンパク質の succination を引き起こすが、その後培地を通常グルコース濃度に戻し 4 日間培養すると細胞内 2SC 化タンパク質が低下することを報告している⁽⁵²⁾。また、腎近位尿細管上皮細胞における AGEs の蓄積がオートファジーにより抑制されることを示す報告があることから、2SC に関しても同様の現象が進行し、細胞内の 2SC 化タンパク質が分解・排出され血中 2SC が増加した可能性がある⁽⁹⁶⁾。増加したフマル酸は HLRCC と同様に Aconitase2 等を修飾し、さらに血液を介して他の組織タンパク質を 2SC 化すると考えられる⁽⁸⁵⁾。また、腎臓は血流を介して様々な代謝物が集められる器官であるため、他の組織で産生された代謝物も腎機能に影響を及ぼす可能性がある。

Zheng らは、還元型グルタチオンの succination が酸化ストレスを誘導することを報告しており、2SC は酸化依存性 AGEs の一種である CML の変化にも関与している可能性がある⁽⁹⁷⁾。そこで血清 AGEs の測定も行い、関連性を評価した。血清中 CML および MG-H1 は共に、腎機能低下に伴って有意に増加し (Fig. 13C, D)、腎移植後に有意に低下した (Fig. 15C, D)。これは、糸球体濾過率の低下に伴い血漿中遊離型 AGEs が増加する、腎移植後に顕著に低下するという先行研究と一致する^(98, 99)。CKD における AGEs の変動に関しては非常に多くの報告があり、生成の増加や腎クリアランス低下、AGEs 前駆体であるジカルボニル化合物を代謝する酵素のダウンレギュレーション等によって説明されている^(77, 98)。また、ヒト皮膚コラーゲンおよびラット骨格筋タンパク質に加え、ヒト血清中でも 2SC と CML には相関性があることが本研究で明らかとなった (Table 7)⁽⁴²⁾。

以上のように、腎機能低下に伴う TCA 回路の異常がさらに腎臓に影響を与え、CKD 増悪の悪循環が形成される可能性がある。多くの尿毒症物質や AGEs と同様に、2SC も腎臓によって尿として体外に排出されるため、腎クリアランスの減少が 2SC の血中濃度増加に寄与する可能性がある⁽⁹⁸⁾。GC-MS 分析によって、ラットでは食餌による 2SC 摂取量とは無関係に、1 日当たり 120 nmol の 2SC が尿から検出されたという報告がある⁽⁴²⁾。ヒト尿中 2SC 量に関する報告はないが、本論文の前処理方法を用いることで LC-MS/MS によって尿中 2SC を測定できると考えられる。

5. 小括

本研究では LC-MS/MS による血清中 2SC の定量法を確立し、2SC 値から腎機能とミトコンドリア機能との関連性を評価した。ミトコンドリア関連代謝物である 2SC の血中レベルは、CKD の重症度や予後、治療の効果等々を評価するバイオマーカーになる可能性がある。

今後、CKD における 2SC 増加や血中へ移行するメカニズムを解明することによって、バイオマーカーとしての有用性のみならず、未だ有効な治療手段のない CKD 進展機構の解明にも繋がると思われる。

今回の臨床データでは血清クレアチニン値から算出された eGFR 値によって腎機能が評価されている。GFR 測定の国際的なゴールドスタンダードであるイヌリンクレアランスによる結果と 2SC 値の比較によって、より厳密に腎機能とミトコンドリア代謝の関連を明らかにできると考えられる。

総括

これまで、加齢や腎臓病において非酵素的な PTM である AGEs との関連性が盛んに論じられてきた。本研究では LC-MS/MS を用いて、新たに測定法を確立した 2SC と AGEs を定量し、生体組織において加齢および病態に伴う変動を評価した。第 1 章では、4, 12, 96 週齢マウスの脳、腎臓、肝臓における 2SC、フマル酸、CML、MG-H1 値を測定し、加齢による変動を明らかにした。加齢に伴い蓄積する PTM 産物は組織によって異なるが、これは各組織における PTM 生成と除去能のバランスを反映している可能性が高い。第 2 章では、ヒト血清中 2SC、フマル酸、CML、MG-H1 値を測定し、腎機能との関連性を評価した。CKD との関連が多数報告されている AGEs よりも 2SC 値の方が既存の腎機能マーカーとの相関性が高いことが、相関係数や ROC 曲線を用いた解析によって示された。本研究は、CKD におけるミトコンドリア代謝異常の関与を裏付けるものであり、2SC と腎機能の関係を明らかにした最初の報告である。

ミトコンドリアは ATP 産生の中心であるため、しばしば生物の「発電機」に例えられる重要な細胞内小器官である。その機能不全はミトコンドリア病として発現し、エネルギー依存性が高い中枢神経系や骨格筋、腎臓等が特に影響を受ける。また近年、加齢関連疾患の発症・進行にもミトコンドリアの機能異常が関与するという報告があり、糖尿病や腎臓病等は「広義の」ミトコンドリア病と呼ばれることもある。

ミトコンドリア機能異常は、ミトコンドリア DNA 異常や ROS 産生等からの報告が多く、代謝の観点では亢進あるいは抑制というように結果が二分化している。その理由として、代謝中間体がすぐに代謝され、常に変動しているためと考えられる。一方、生体中 2SC は、従来の有機酸測定では捉えることが困難であった代謝の変化を反映しており、安定的に測定され、その変動を評価できる可能性がある。また、本研究で確立した LC-MS/MS による測定法の場合、固相抽出カラムやフィルターを用いた前処理が中心である。これは、GC-MS と比較して簡便かつ単純な処理であるため、臨床分野でのバイオマーカーとしての利用や、多検体を一度に処理するための自動処理化への応用も可能であると考えられる。

前述した通り、現在、ミトコンドリア機能の評価する最も有用な検査は、患者の骨格筋の一部を採取してミトコンドリア酵素活性の測定や遺伝子解析を実施する「筋生検」である。しかし、筋生検は侵襲性が高く、麻酔使用による合併症を発症することがあり、患者への身体的、精神的な負担も大きい。第 2 章で確立した液体サンプル中 2SC の評価法は、加齢や病態に伴うミトコンドリア機能を低侵襲的かつ早期に診断する上で有用な技術になると期待される。

本研究では生体における PTM 変動の評価を行い、その増加メカニズムは先行研究から類推するにとどまっている。今後は、組織における局在、2SC 代謝・排出の経路や機序等を実験的に明らかにすることが必要である。また、CKD 以外の加齢関連疾患における血液や尿中 2SC 値を測定し、病態との関連を評価することができれば、2SC 研究の応用範囲はさらに広がりを見せる。そして、過剰なフマル酸産生やタンパク質の修飾による機能異常、および病態の発症と重症化を防ぐ薬剤や機能性食品、生活習慣の解明へと繋がっていくと考え

られる。本研究で得られた知見は、将来的に人々の健康寿命延伸およびQOL向上に寄与し、早期の死亡や要介護につながる重篤な状態への進行を防ぐことで、医療費の増大やヤングケアラー問題、貧困、働き手不足等の社会問題解決の一助となることが期待される。

使用した試薬

- ・ イソフルラン: Isoflurane [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 099-06571]
- ・ 塩化ナトリウム: Sodium chloride (saline) [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 191-01665]
- ・ Triton X-100 [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 203-03215]
- ・ 100 mM sodium borate buffer (pH 9.1)
 - －Boric Acid [和光純薬工業株式会社, 021-02195]
 - －Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (DTPA)
[Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 347-01141]
 - －Sodium Hydroxide (NaOH) [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 195-02165]
- ・ 2 M 水素化ホウ素ナトリウム 0.1 M 水酸化ナトリウム:
 - －NaBH₄ [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation,]
 - －Sodium Hydroxide (NaOH) [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 195-02165]
- ・ トリクロロ酢酸: Trichloroacetic acid [関東化学株式会社, 40243-00]
- ・ 6M 塩酸: 20% Hydrochloric Acid [FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 088-01805]
- ・ アンモニア: Ammonia Solution (28%) アンモニア水 [ナカライテスク株式会社, 02512-95]
- ・ TFA: 和光特級 Trifluoroacetic Acid トリフルオロ酢酸 [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 208-02741]
- ・ アセトニトリル: 試薬特級 Acetonitrile [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 014-00381]
- ・ メタノール: 高速液体クロマトグラフ用 Methanol [ナカライテスク株式会社, 21929-23]
- ・ 蒸留水: 高速液体クロマトグラフ用 Distilled Water [ナカライテスク株式会社, 14029-33]
- ・ アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用特製試薬 Acetonitrile [ナカライテスク株式会社, 00430-83]
- ・ ギ酸: 高速液体クロマトグラフ用 Formic Acid (98~100%) [ナカライテスク株式会社, 08965-82]
- ・ Lysine 塩酸塩: L(+)-Lysine Hydrochloride [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 125-01465]
- ・ Pierce BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific, 23225]
- ・ Fumarate Assay Kit [Sigma-Aldrich, MAK060]

使用した器具・機器

器具

- ・ Captiva ND^{Lipids} cartridge [Agilent Technologies, A5300635]
- ・ Sep-Pak C18 3 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 55-105 μm , 50/pk [Waters Corporation, WAT023590]
- ・ 陽イオン交換カラム: StrataTM-X-C 33 μm Polymeric Strong Cation 30 mg/1 mL, Tubes [phenomenex, 8B-S029-TAK]
- ・ VIVASPIN 500 フィルター: VIVASPIN 500 Membrane: 3,000 MWCO PES [Sartorius stedim, VS0192]
- ・ 0.45 μm フィルター (Syringe-driven Filter Unit):
 - ー テルモシリンジ 1 mL [テルモ株式会社, SS-01P]
 - ー Millex-LH, 0.45 μm , 親水性, PTFE, 4 mm, 非滅菌 [Merck KGaA, SLLHH04NK]
- ・ バイアル:
 - ー 標準ロマイクロバイアル PP 500 μL コニカル [Tomsic, 200-2641]
 - ー 8-425 ストレートキャップ (PP/ホワイト) [Tomsic, 200-2991]
 - ー 8 mm セプタム (レッド PTFE/ホワイトシリコン) 60mils [Tomsic, 200-3321]
 - ー 6 mm インサート 500 μL (375 μL) ガラスフラット [Tomsic, 200-6682]

機器

- ・ POLYTRON® Homogenizers: [Kinematica AG, PT 10-35 GT]
- ・ Teflon homogenizer [Nippi, BioMasher II]
- ・ Ultrasonic Disruptor [TOMY]
- ・ 吹付け式試験管濃縮装置: [東京理化学器械株式会社, MG-2200]
- ・ ソニケーター: BRANSONIC ULTRASONIC CLEANER [BRANSON/ヤマト科学株式会社, 3510J-MTH]
- ・ バキュームマニホールド [SUPELCO]
- ・ 遠心分離機:
 - ー テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3520 [久保田商事株式会社]
 - ー テーブルトップ冷却遠心機 2800 [久保田商事株式会社]
- ・ Microplate Reader: Tecan infinite M PLEX [Tecan Japan Co., Ltd.]
- ・ 遠心濃縮機
 - ー 遠心エバポレーター [東京理化学器械株式会社, CVE-3110]
 - ー 冷却トラップ [東京理化学器械株式会社, UT-1000]
 - ー Edwards 1.5 Vacuum Pump [Nidec LEROY-SOMER Holding]
- ・ LC-MS/MS
 - ー LC 部: UltiMate 3000 HPLC system (デガッサ・ポンプ・オートサンプラー・カラムコンパートメント) [Thermo Fisher Scientific]

- カラム: SeQuant® ZIC®-HILIC column [150 × 2.1 mm, 5 μm, 200 Å; Merck KGaA]
- MS 部: TSQ Quantiva トリプル四重極質量分析計 [Thermo Fisher Scientific]
- 窒素ガス発生装置: N2 GENERATOR AT-24NC [株式会社エアーテック]

謝辞

本研究を遂行する際に終始ご指導していただきました永井竜児教授ならびに永井美芽先生、須川日加里先生、そして東海大学医学部移植外科 中村道郎教授に心より感謝申し上げます。

また、博士論文作成にあたりご指導して頂きました主査の米田一成教授、副査の今川和彦教授、山口浩教授、佐藤祐介准教授に心よりお礼申し上げます。

食品生体調節学研究室一同 (敬称略、五十音順)

永井竜児 教授

スタッフ: 井陽太、須川日加里、永井美芽

大学院生: 加藤紗優里、栗林慎太郎、佐藤優、高橋姫乃、富永悠幹、平岡良隆、山口広子

学部生: 岩根孝大、猿渡海史、田部滉大、村上兼史郎、森下彰仁、和田健希
青野克恕、石窪健人、小澤優香、笠井晶仁、清水奏那、玉木あおい

参考文献

1. Global Health Estimates. The top 10 causes of death. World Health Organization (WHO). 2020-12-09. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, (参照 2022-10-19).
2. World Health Organization. Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2020. World Health Organization (WHO). 2020-6-12. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000490>, (参照 2023-1-7).
3. de Magalhães JP, Stevens M, Thornton D. The Business of Anti-Aging Science. *Trends Biotechnol* 2017; **35(11)**: 1062-1073.
4. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003; **21(3)**: 255-261.
5. Nagai R, Brock JW, Blatnik M, Baatz JE, Bethard J, Walla MD, Thorpe SR, Baynes JW, Frizzell N. Succination of protein thiols during adipocyte maturation: a biomarker of mitochondrial stress. *J Biol Chem* 2007; **282(47)**: 34219-34228.
6. Blatnik M, Frizzell N, Thorpe SR, Baynes JW. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes: formation of S-(2-succinyl)cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress. *Diabetes* 2008; **57(1)**: 41-49.
7. Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, Nagai R, Carson JA, Thorpe SR, Baynes JW. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. *J Biol Chem* 2009; **284(38)**: 25772-25781.
8. Nagai R, Shirakawa J, Fujiwara Y, Ohno R, Moroishi N, Sakata N, Nagai M. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr* 2014; **55(1)**: 1-6.
9. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; **67(1)**: 3-21.
10. Nagai R, Hayashi CM, Xia L, Takeya M, Horiuchi S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J Biol Chem* 2002; **277(50)**: 48905-48912.
11. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; **211(4481)**: 491-493.
12. Barzilay JI, Bůžková P, Ziemann SJ, Kizer JR, Djoussé L, Ix JH, Tracy RP, Siscovick DS, Cauley JA, Mukamal KJ. Circulating levels of carboxy-methyl-lysine (CML) are associated with hip fracture risk: the Cardiovascular Health Study. *J Bone Miner Res* 2014; **29(5)**: 1061-1066.
13. Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1995; **270(17)**: 10017-10026.
14. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end

- products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008; **153(1)**: 6-20.
15. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycooxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; **99(3)**: 457-468.
 16. Miki Hayashi C, Nagai R, Miyazaki K, Hayase F, Araki T, Ono T, Horiuchi S. Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Invest* 2002; **82(6)**: 795-808.
 17. Phillips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 1993; **212(1)**: 101-105.
 18. Lai SWT, Lopez Gonzalez EJ, Zoukari T, Ki P, Shuck SC. Methylglyoxal and Its Adducts: Induction, Repair, and Association with Disease. *Chem Res Toxicol* 2022; **35(10)**: 1720-1746.
 19. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999; **344 Pt 1(Pt 1)**: 109-116.
 20. Merkley ED, Metz TO, Smith RD, Baynes JW, Frizzell N. The succinated proteome. *Mass Spectrom Rev* 2014; **33(2)**: 98-109.
 21. Faragher RG. Cell senescence and human aging: where's the link?. *Biochem Soc Trans* 2000; **28(2)**: 221-226.
 22. 瀬尾芳輝. 高齢者医療の現状と展望 —各領域のトピックス— 加齢による身体機能の変化. *Dokkyo Journal of Medical Sciences* 2017; **44(3)**: 257-263.
 23. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 2010; **464(7288)**: 529-535.
 24. Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: 41-66.
 25. Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. Age specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore longitudinal study of aging. *Neurology* 2000; **54(11)**: 2072-2077.
 26. Kukull WA, Higdon R, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Schellenberg GD, van Belle G, Jolley L, Larson EB. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol* 2002; **59(11)**: 1737-1746.
 27. Stahl EC, Haschak MJ, Popovic B, Brown BN. Macrophages in the Aging Liver and Age-Related Liver Disease. *Front Immunol* 2018; **9**: 2795.
 28. Fang Y, Gong AY, Haller ST, Dworkin LD, Liu Z, Gong R. The ageing kidney: Molecular mechanisms and clinical implications. *Ageing Res Rev* 2020; **63**: 101151.
 29. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989; **264(36)**: 21597-21602.

30. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002; **31(1)**: 1-7.
31. Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 1997; **324(Pt 2)(Pt 2)**: 565-570.
32. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000; **275(50)**: 39027-39031.
33. Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI, Porozov YB, Terentiev AA. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 3085756.
34. Lee HY, Choi CS, Birkenfeld AL, Alves TC, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Zhang D, Woo DK, Shadel GS, Ladiges W, Rabinovitch PS, Santos JH, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI. Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab* 2010; **12(6)**: 668-674.
35. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; **153(6)**: 1194-1217.
36. Khrapko K, Vijg J. Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details?. *Trends Genet* 2009; **25(2)**: 91-98.
37. Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, Naudí A, Cabré R, Mota-Martorell N, López-Torres M, González-Sánchez M, Pamplona R, Barja G. Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level, and increases autophagy, in the liver of middle-aged mice. *Exp Gerontol* 2016; **83**: 130-138.
38. Sun N, Yun J, Liu J, Malide D, Liu C, Rovira II, Holmström KM, Fergusson MM, Yoo YH, Combs CA, Finkel T. Measuring In Vivo Mitophagy. *Mol Cell* 2015; **60(4)**: 685-696.
39. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; **333(6046)**: 1109-1112.
40. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, Shirakawa K, Lim HW, Davis SS, Ramanathan A, Gerencser AA, Verdin E, Campisi J. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* 2016; **23(2)**: 303-314.
41. Herbst A, Pak JW, McKenzie D, Bua E, Bassiouni M, Aiken JM. Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; **62(3)**: 235-245.
42. Alderson NL, Wang Y, Blatnik M, Frizzell N, Walla MD, Lyons TJ, Alt N, Carson JA, Nagai R, Thorpe SR, Baynes JW. S-(2-Succinyl)cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate. *Arch Biochem Biophys* 2006; **450(1)**: 1-8.

43. López-González I, Aso E, Carmona M, Armand-Ugon M, Blanco R, Naudí A, Cabré R, Portero-Otín M, Pamplona R, Ferrer I. Neuroinflammatory Gene Regulation, Mitochondrial Function, Oxidative Stress, and Brain Lipid Modifications With Disease Progression in Tau P301S Transgenic Mice as a Model of Frontotemporal Lobar Degeneration-Tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; **74(10)**: 975-999.
44. Naudí A, Cabré R, Dominguez-Gonzalez M, Ayala V, Jové M, Mota-Martorell N, Piñol-Ripoll G, Gil-Villar MP, Rué M, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R. Region-specific vulnerability to lipid peroxidation and evidence of neuronal mechanisms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the healthy adult human central nervous system. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017; **1862(5)**: 485-495.
45. Cabré R, Naudí A, Dominguez-Gonzalez M, Ayala V, Jové M, Mota-Martorell N, Piñol-Ripoll G, Gil-Villar MP, Rué M, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R. Sixty years old is the breakpoint of human frontal cortex aging. *Free Radic Biol Med* 2017; **103**: 14-22.
46. Nagai R, Araki T, Hayashi CM, Hayase F, Horiuchi S. Identification of N epsilon-(carboxyethyl)lysine, one of the methylglyoxal-derived AGE structures, in glucose-modified protein: mechanism for protein modification by reactive aldehydes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; **788(1)**: 75-84.
47. Yamaguchi H, Nagai M, Sugawa H, Yasuda H, Nagai R. Development of a conventional immunochemical detection system for determination of N^ε-(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine in methylglyoxal-modified proteins. *Glycoconj J* 2021; **38(3)**: 293-301.
48. Yamanaka M, Matsumura T, Ohno R, Fujiwara Y, Shinagawa M, Sugawa H, Hatano K, Shirakawa J, Kinoshita H, Ito K, Sakata N, Araki E, Nagai R. Non-invasive measurement of skin autofluorescence to evaluate diabetic complications. *J Clin Biochem Nutr* 2016; **58(2)**: 135-140.
49. Postma M, Goedhart J. PlotsOfData-A web app for visualizing data together with their summaries. *PLoS Biol* 2019; **17(3)**: e3000202.
50. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ R' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48(3)**: 452-458.
51. Schaum N, Lehallier B, Hahn O, Pálovics R, Hosseinzadeh S, Lee SE, Sit R, Lee DP, Losada PM, Zardeneta ME, Fehlmann T, Webber JT, McGeever A, Calcuttawala K, Zhang H, Berdnik D, Mathur V, Tan W, Zee A, Tan M; Tabula Muris Consortium; Pisco AO, Karkani J, Neff NF, Keller A, Darmanis S, Quake SR, Wyss-Coray T. Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature* 2020; **583(7817)**: 596-602.
52. Frizzell N, Thomas SA, Carson JA, Baynes JW. Mitochondrial stress causes increased succination of proteins in adipocytes in response to glucotoxicity. *Biochem J* 2012; **445(2)**: 247-254.
53. Stein LR, Imai S. Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *EMBO J* 2014; **33(12)**: 1321-1340.

54. Zhou CC, Yang X, Hua X, Liu J, Fan MB, Li GQ, Song J, Xu TY, Li ZY, Guan YF, Wang P, Miao CY. Hepatic NAD(+) deficiency as a therapeutic target for non-alcoholic fatty liver disease in ageing. *Br J Pharmacol* 2016; **173(15)**: 2352-2368.
55. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One* 2011; **6(4)**: e19194.
56. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 2011; **14(6)**: 724-738.
57. Grimm A, Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem* 2017; **143(4)**: 418-431.
58. Piroli GG, Manuel AM, Walla MD, Jepson MJ, Brock JW, Rajesh MP, Tanis RM, Cotham WE, Frizzell N. Identification of protein succination as a novel modification of tubulin. *Biochem J* 2014; **462(2)**: 231-245.
59. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, Patalas-Krawczyk P, Borchard S, Jędrak P, Pierzynowska K, Szymański J, Wang DQ, Portincasa P, Węgrzyn G, Zischka H, Dobrzym P, Bonora M, Duszyński J, Rimessi A, Karkucinska-Wieckowska A, Dobrzym A, Szabadkai G, Zavan B, Oliveira PJ, Sardao VA, Pinton P, Wieckowski MR. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018; **340**: 209-344.
60. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 2008; **134(1)**: 112-123.
61. Toriumi K, Berto S, Koike S, Usui N, Dan T, Suzuki K, Miyashita M, Horiuchi Y, Yoshikawa A, Asakura M, Nagahama K, Lin HC, Sugaya Y, Watanabe T, Kano M, Ogasawara Y, Miyata T, Itokawa M, Konopka G, Arai M. Combined glyoxalase 1 dysfunction and vitamin B6 deficiency in a schizophrenia model system causes mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex. *Redox Biol* 2021; **45**: 102057.
62. 富野康日己. メディカルスタッフのための腎臓病学改訂 2 版. 中外医学社, 2017, P2-6
63. 長田太助. 腎臓内科グリーンノート. 中外医学社, 2021, P1-5
64. 大塚泰史. 超音波による腎サイズ計測の意義. *日本小児腎臓病学会雑誌* 2020; **33(1)**: 9-16.
65. 一般社団法人 日本腎臓学会. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018. 株式会社 東京医学社, 2018.
66. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A; Collaborators developing the Japanese equation for estimated GFR. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* 2009; **53(6)**: 982-992.
67. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes

- among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 2004; **164(6)**: 659-663.
68. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; **351(13)**: 1296-1305.
69. 松井勝, 斎藤 能彦. 心腎連関の新展開. *日本内科学会雑誌* 2017; **106(5)**: 911-918.
70. Dąbrowska-Bender M, Dykowska G, Żuk W, Milewska M, Staniszewska A. The impact on quality of life of dialysis patients with renal insufficiency. *Patient Prefer Adherence* 2018; **12**: 577-583.
71. Hsu CC, Huang CC, Chang YC, Chen JS, Tsai WC, Wang KY. A comparison of quality of life between patients treated with different dialysis modalities in Taiwan. *PLoS One* 2020; **15(1)**: e0227297.
72. 日本臨床腎移植学会・日本移植学会. 腎移植臨床登録集計報告 (2021) 2020 年実施症例の集計報告と追跡調査結果. *移植* 2021; **56(3)**: 195-216.
73. 花房規男, 阿部雅紀, 常喜信彦, 星野純一, 菊地勘, 後藤俊介, 神田英一郎, 谷口正智, 中井滋, 長沼俊秀, 長谷川毅, 三浦健一郎, 和田篤志, 武本佳昭. わが国の慢性透析療法の実況 (2020 年 12 月 31 日現在). *透析会誌* 2021; **54(12)**: 611-657.
74. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020; **395(10225)**: 709-733.
75. Hasegawa S, Jao TM, Inagi R. Dietary Metabolites and Chronic Kidney Disease. *Nutrients* 2017; **9(4)**: 358.
76. Taguchi K, Elias BC, Brooks CR, Ueda S, Fukami K. Uremic Toxin-Targeting as a Therapeutic Strategy for Preventing Cardiorenal Syndrome. *Circ J* 2019; **84(1)**: 2-8.
77. Stinghen AE, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2016; **27(2)**: 354-370.
78. O'Connor PM. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33(10)**: 961-967.
79. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2017; **13(10)**: 629-646.
80. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; **306(4)**: F367-F378.
81. Tang C, Dong Z. Mitochondria in Kidney Injury: When the Power Plant Fails. *J Am Soc Nephrol* 2016; **27(7)**: 1869-1872.
82. Braga PC, Alves MG, Rodrigues AS, Oliveira PF. Mitochondrial Pathophysiology on Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 2022; **23(3)**: 1776.
83. Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan KL. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and

- succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* 2012; **26(12)**: 1326-1338.
84. Bardella C, El-Bahrawy M, Frizzell N, Adam J, Ternette N, Hatipoglu E, Howarth K, O'Flaherty L, Roberts I, Turner G, Taylor J, Giaslakitotis K, Macaulay VM, Harris AL, Chandra A, Lehtonen HJ, Launonen V, Aaltonen LA, Pugh CW, Mihai R, Trudgian D, Kessler B, Baynes JW, Ratcliffe PJ, Tomlinson IP, Pollard PJ. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status. *J Pathol* 2011; **225(1)**: 4-11.
 85. Ternette N, Yang M, Laroyia M, Kitagawa M, O'Flaherty L, Wolhulter K, Igarashi K, Saito K, Kato K, Fischer R, Berquand A, Kessler BM, Lappin T, Frizzell N, Soga T, Adam J, Pollard PJ. Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency. *Cell Rep* 2013; **3(3)**: 689-700.
 86. Thomas SA, Storey KB, Baynes JW, Frizzell N. Tissue distribution of S-(2-succino)cysteine (2SC), a biomarker of mitochondrial stress in obesity and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2012; **20(2)**: 263-269.
 87. González J, Gracia-Lavedan E, Pamplona R, Fernández E, Lecube A, de-Torres JP, Barbé F, Torres G; ILERVAS Study Group. Protein succination as a potential surrogate biomarker of airway obstruction. The ilervas project. *Respir Med* 2020; **172**: 106124.
 88. Jiménez-Urbe AP, Hernández-Cruz EY, Ramírez-Magaña KJ, Pedraza-Chaverri J. Involvement of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Kidney Diseases. *Biomolecules* 2021; **11(9)**: 1259.
 89. Li M, Wang X, Aa J, Qin W, Zha W, Ge Y, Liu L, Zheng T, Cao B, Shi J, Zhao C, Wang X, Yu X, Wang G, Liu Z. GC/TOFMS analysis of metabolites in serum and urine reveals metabolic perturbation of TCA cycle in db/db mice involved in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **304(11)**: F1317-F1324.
 90. Sas KM, Kayampilly P, Byun J, Nair V, Hinder LM, Hur J, Zhang H, Lin C, Qi NR, Michailidis G, Groop PH, Nelson RG, Darshi M, Sharma K, Schelling JR, Sedor JR, Pop-Busui R, Weinberg JM, Soleimanpour SA, Abcouwer SF, Gardner TW, Burant CF, Feldman EL, Kretzler M, Brosius FC 3rd, Pennathur S. Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight* 2016; **1(15)**: e86976.
 91. Hallan S, Afkarian M, Zelnick LR, Kestenbaum B, Sharma S, Saito R, Darshi M, Barding G, Raftery D, Ju W, Kretzler M, Sharma K, de Boer IH. Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. *EBioMedicine* 2017; **26**: 68-77.
 92. Khattri RB, Thome T, Ryan TE. Tissue-Specific ¹H-NMR Metabolomic Profiling in Mice with Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Metabolites* 2021; **11(1)**: 45.
 93. Parikh S, Goldstein A, Koenig MK, Scaglia F, Enns GM, Saneto R, Anselm I, Cohen BH, Falk MJ, Greene C, Gropman AL, Haas R, Hirano M, Morgan P, Sims K, Tarnopolsky M, Van Hove JL, Wolfe L, DiMauro S. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus

statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet Med* 2015; **17(9)**: 689-701.

94. Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, Isohanni P, Marjavaara SK, Tyni T, Kiuru-Enari S, Pihko H, Darin N, Öunap K, Kluijtmans LA, Paetau A, Buzkova J, Bindoff LA, Annunen-Rasila J, Uusimaa J, Rissanen A, Yki-Järvinen H, Hirano M, Tulinius M, Smeitink J, Tyynismaa H. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol* 2011; **10(9)**: 806-818.
95. Hasegawa K, Wakino S, Simic P, Sakamaki Y, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Kubota E, Tokuyama H, Hayashi K, Guarente L, Itoh H. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat Med* 2013; **19(11)**: 1496-1504.
96. Takahashi A, Takabatake Y, Kimura T, Maejima I, Namba T, Yamamoto T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yoshimori T, Isaka Y. Autophagy Inhibits the Accumulation of Advanced Glycation End Products by Promoting Lysosomal Biogenesis and Function in the Kidney Proximal Tubules. *Diabetes* 2017; **66(5)**: 1359-1372.
97. Zheng L, Cardaci S, Jerby L, MacKenzie ED, Sciacovelli M, Johnson TI, Gaude E, King A, Leach JD, Edrada-Ebel R, Hedley A, Morrice NA, Kalna G, Blyth K, Ruppin E, Frezza C, Gottlieb E. Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nat Commun* 2015; **6**: 6001.
98. Rabbani N, Thornalley PJ. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2018; **93(4)**: 803-813.
99. Martens RJH, Broers NJH, Canaud B, Christiaans MHL, Cornelis T, Gauly A, Hermans MMH, Konings CJAM, van der Sande FM, Scheijen JLJM, Stiff F, Kooman JP, Schalkwijk CG. Advanced glycation endproducts and dicarbonyls in end-stage renal disease: associations with uraemia and courses following renal replacement therapy. *Clin Kidney J* 2019; **13(5)**: 855-866.

本論文に関わる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである。

Katsuta N, Takahashi H, Nagai M, Sugawa H, Nagai R. Changes in *S*-(2-succinyl)cysteine and advanced glycation end-products levels in mouse tissues associated with aging. *Amino Acids* 2022; **54(4)**: 653-661.

This thesis was reproduced with permission from Springer Nature.

Katsuta N, Nagai M, Saruwatari K, Nakamura M, Nagai R. Mitochondrial stress and glycooxidation increase with decreased kidney function. *J Clin Biochem Nutr* 2023; **72(2)**: 147-156.