

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19410

研究課題名(和文)メタボロミクス解析によるサルコイドーシス新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)New biomarkers for sarcoidosis by metabolomics analysis using plasma and urine from patients.

研究代表者

村松 聡士(Muramatsu, Soshi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30732549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシスは未だ疾患の発症や増悪のメカニズムがはっきりとしていない疾患であるが、非乾酪性肉芽腫形成を特徴とする疾患であることが知られている。肉芽腫形成に關与しているリンパ球やマクロファージの分化や機能に關与している代謝物に注目し、ステロイド非投与でサルコイドーシスの疾患活動性の高い患者群、低い患者群と分け、患者それぞれより得られた血液検体および尿検体でメタボロミクス解析を行い、血液検体からは9つの化合物を、尿検体からは1つの化合物を得られた。

研究成果の概要(英文)：Sarcoidosis is a systemic disease of unknown cause that is characterized by the formation of immune non-caseating granulomas in various organs, mainly the lungs and the mediastinal/bilateral hilar lymph nodes. To find candidates for disease biomarkers of sarcoidosis, we collected over 100 plasma and urine from patients with active and inactive sarcoidosis, and analyzed the correlation of difference between analytes by HCA analysis using over 150 metabolites detected by GC-MS/MS assays. In the comparison between active and inactive sarcoidosis using serum, 9 metabolites were found to be significantly dysregulated in active sarcoidosis, when a significance level of  $p < 0.05$  was applied. In case of the comparison using urine, significance was accepted as  $p < 0.15$ .

研究分野：呼吸器内科

キーワード：メタボロミクス解析 新規バイオマーカー フェノタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは原因不明の全身性(多臓器性)肉芽腫性疾患で、その病理像は類上皮細胞肉芽腫を特徴とする。頻度は人口 10 万人に対して 10~20 人程度と比較的稀であり、当研究分野に通院している患者は現在 250 人程度である。20 歳代の男女と 40 歳以上の女性が多く、両側肺門リンパ節、肺、眼、皮膚に病変をきたすことが多いが、心臓、脳神経系、筋肉、骨など複数の臓器にも病変を作り得る。典型例では、職場の健診にて無症状で発見される場合とぶどう膜炎を契機に眼科から内科へ紹介される場合が多い。どちらも呼吸器症状が乏しいにも関わらずに気管支内視鏡検査などの侵襲的な検査を必要とし、診断のため患者に多大な負担がかかっている。また近年画像診断の進歩もありサルコイドーシスの予後を規定する心臓病変の存在が先に示唆され、生命の危険が想定されるために十分な全身検索がされないまま治療を先行する場合も増えてきている。診断後も約 60%が自然寛解する一方で、徐々に増悪しステロイド全身投与を必要とする症例まで経過の幅が広いこと病態の把握には不確定要素が多い。申請者は 2000 年~2011 年に当分野で新規診断されたサルコイドーシス患者 162 例を対象に、有用な予後予測因子の探索を行った。BALF 中リンパ球分画や CD4/8 比は診断時しか採取できず予後との関連の検討が困難であった。血清 ACE 値、sIL-2R 値の変動の割合(ACE、sIL-2R)が弱い予後予測因子となり得ることを示したが、臨床応用には診断や予後予測のための新規バイオマーカーの確立が急務である。

## 2. 研究の目的

本研究の主題は、難病の一つであるサルコイドーシスの診断および予後予測が可能な新規バイオマーカーを探索し、患者血液あるいは尿などの非侵襲的な検体によって行う臨床検査診断システムを構築することである。サルコイドーシスは従来より診断困難であり、活動性指標や予後予測因子も確立していない。本研究では近年注目される生体内の病態を最も良く反映すると言われる代謝物解析すなわちメタボロミクス解析を用いて、サルコイドーシス発症に関与しているとされるアクネ菌由来の、あるいは宿主生体反応由来の代謝産物を、臨床経過を反映する疾患特異的バイオマーカーとして抽出し確立する。新規診断法だけでなく治療介入すべき症例の抽出など新規治療戦略の確立に寄与することも可能とする。

## 3. 研究の方法

(1) 患者からの血液、尿、気管支肺胞洗浄などの検体採取・保存

事前に説明し同意を得た当院サルコイドーシス専門外来に通院中の症例で、通常診療の範囲で採取する血液、尿、気管支肺胞洗浄液(BAL 液)など臨床検体を専用容器に保存し代謝産物の安定化のために即冷却を行う。検体の採取は活動性の高い時点(概ね診断時)と自然寛解後の 2 点を想定しているが、寛解-増悪を繰り返す症例では複数回採取することもあり得る。

(2) LC-TOF/MS による非標的メタボロミクス解析(網羅的代謝産物解析)

液体クロマトグラフィーに高分解能型質量分析計を接続した UPLC-TOF/MS 及び LC-FTMS を選択し、得られたデータは ProgenesisQ1 による Alignment 及び Peak Picking を行った後、Database Research により化合物を同定する。

(3) GC/MS および LC-MS/MS による標的メタボロミクス解析

標的メタボロミクス解析の対象として用いる既存の代謝物は、共同研究者である三枝が LC-MS/MS(TSQ Quantum Ultra, TSQ Quantiva)(Thermo Fisher Scientific)を導入し、高分離条件にて定量を可能とする分析系を既に構築しており、難揮発性あるいは熱に不安定な化合物の分析も可能となっている。非標的メタボロミクス解析の各測定モードにおいて、それぞれ 5,000 種程度のイオンを検出することが可能となっており、標的メタボロミクス解析において 300 種程度の化合物の定量法の構築に成功している。

## 4. 研究成果

本研究に同意したサルコイドーシス患者において、まずは 100 例の検体および 4 例の健常者検体に対して、LC-TOF/MS による非標的メタボロミクス解析を行った。サルコイドーシス患者血液検体において有意に減少しているリン脂質化合物および尿検体で有意に増加しているムコ多糖類を同定した。その後、ある程度の傾向を踏まえた上で GC/MS および LC-MS/MS による標的メタボロミクス解析を行った。非標的メタボロミクス解析では健常者とサルコイドーシス患者間での比較を行ったが、標的メタボロミクス解析ではサルコイドーシスの活動性に着目し、薬剤による代謝経路への影響を少なくするために、サルコイドーシス患者のうち全身ステロイド投与歴のない 54 例を対象とし、それらのうち、検診あるいは何らかの症状を契機に診断された新規診断の 9 例、長期間フォローを行っている患者で、症状・肺野画像所見が明らかに増悪した 16 例の合わせて 25 例を活動性がある群とし、その他の 29 例を活動性がない群とに分け(図 1)得られた血液、尿検体を速やかに冷凍保存した後に後日まとめて分析を行った。

	Active state	Inactive state	p value	
Number	25	29		
Gender (Female)	16 (70%)	15 (50%)	$p = 0.17$	
Age (years old)	51.5 ± 2.8	55.3 ± 3.1	$p = 0.47$	
Smoking status (current/ex-)	12 (52%)	19 (63%)	$p = 0.57$	
Stage	1	7 (30%)	10 (33%)	$p = 1.00$
	2	12 (52%)	17 (57%)	$p = 0.79$
	3 or 4	4 (18%)	3 (10%)	$p = 0.45$
Organ involvement				
Eye	12 (52%)	13 (43%)	$p = 0.59$	
Skin	7 (30%)	7 (23%)	$p = 0.75$	
Heart	3 (13%)	2 (7%)	$p = 0.64$	
Others	12 (52%)	9 (30%)	$p = 0.16$	
Serum ACE (U/L)	18.2 ± 1.8	15.1 ± 1.0	$p = 0.12$	
Serum sIL-2R (U/mL)	861 ± 112	432 ± 37	** $p = 0.0001$	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.5 ± 0.6	23.5 ± 0.6	* $p = 0.02$	

図 1 患者背景

上記患者群の血液および尿検体に対して非標的メタボロミクス解析を行い、患者群間で増減傾向のある化合物の同定を行った。その後 GC/MS にて Smart Metabolites Database (475 成分同時検出系) により検出された 165 種の化合物を成分とした階層的クラスター分析を実施し、Heat map を作成した(図 2)。

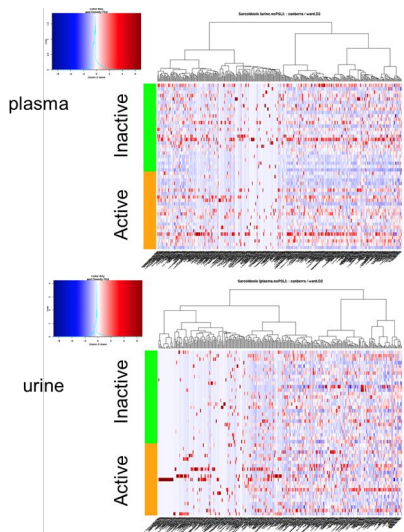


図 2 階層的クラスター分析による Heat map

これら化合物のうち、活動性のある患者群の血液検体と活動性のない患者群の検体とを比べて、増加していた化合物を 10 つ同定し、尿検体でも同様に 8 つの化合物を同定した(図 3)。

Metabolites	Active		Inactive		P value
	Area Ratio	SD	Area Ratio	SD	
Plasma 5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	0.000353	0.00120	0.000370	0.002301	*0.0154
Plasma Adenosine	0.00104	0.00257	0.000220	0.000116	*0.0318
Plasma Azelaic acid	0.000352	0.000637	0.000140	0.000545	*0.0324
Plasma Cadaverine	0.00201	0.00114	0.00141	0.00126	*0.0472
Plasma Eicosapentaenoic acid	0.000521	0.000746	0.000149	0.000346	*0.0382
Plasma Homocysteine	0.002032323	0.00142	0.00151	0.00154	*0.0404
Plasma Quinolnic acid	0.00026	0.0130	0.00269	0.00936	*0.0626
Plasma Thymine	0.000641	0.00134	0.0000858	0.000315	*0.0369
Plasma Tryptamine	0.00734	0.00538	0.00436	0.00459	0.0563
Plasma Tyramine	0.123	0.174	0.0427	0.0972	*0.0375
Urine 1-Hexadecanol	0.000205	0.0000819	0.000242	0.0000892	0.111
Urine 3-Aminoglutamic acid	0.00060	0.0112	0.00267	0.00586	0.0906
Urine 7-Methylguanidine	0.0137	0.0176	0.00614	0.00832	0.105
Urine Allotse	0.0282	0.0461	0.0420	0.0597	0.115
Urine Glutamic acid	0.000323	0.000635	0.000552	0.000740	0.108
Urine Histidine	0.0136	0.0478	0.0105	0.0523	0.0682
Urine Oxalic acid	0.0101	0.0107	0.0141	0.0113	0.129
Urine Quinolnic acid	0.117	0.0850	0.0659	0.0506	*0.0314

図 3 新規バイオマーカー候補の化合物

本研究により新規バイオマーカー候補の化合物を数種類同定した。微量な化合物の解析であることから、検体採取手技の誤差、保存状態の誤差、測定機器の誤差などに影響を受けてしまう可能性があるが、単一施設で行

うことでこれらのバイアスを最小化している。現在も参加者からの検体数は増加しており、誤差をより減らせるものと考えられる。今後は有力な化合物に絞った上で、安定的な測定法を確立し東北メディカル・メガバンクに保存されている健常者検体との標的メタボロミクス解析を行い、実臨床で有用な因子を検索していく予定である。

## 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)

Numakura T, Tamada T, Nara M, Muramatsu S, Murakami K, Kikuchi T, Kobayashi M, Muroi M, Okazaki T, Takagi S, Eishi Y, Ichinose M. Simultaneous development of sarcoidosis and cutaneous vasculitis in a patient with refractory crohn's disease during infliximab therapy. BMC Pulm Med 2016; 41:211-217 doi:10.1186/s12890-016-0193-5. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

有竹秀美、村上康司、玉田 勉、蒲生俊一、村松聡士、奈良正之、一ノ瀬正和 特徴的な腎病変と眼病変を有し、TINU 症候群との鑑別が問題となった兄弟発症サルコイドーシスの 1 例 第 37 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 ウィンク愛知(名古屋市) 2017 年 11 月 4 日

村上康司、玉田 勉、奈良正之、村松聡士、蒲生俊一、有竹秀美、杉浦久敏、一ノ瀬正和 当科サルコイドーシス患者の肺病変に対する外来全身ステロイド療法の実績 第 37 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 ウィンク愛知(名古屋市) 2017 年 11 月 3 日

蒲生俊一、玉田 勉、村上康司、三枝大輔、元池育子、有竹秀美、奈良正之、村松聡士、杉浦久敏、一ノ瀬正和 メタボロミクス解析を用いたサルコイドーシスの活動性予測バイオマーカーの検索 第 37 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 ウィンク愛知(名古屋市) 2017 年 11 月 3 日

村松聡士、玉田 勉、奈良正之、村上康司、蒲生俊一、丸山和一、久野貴司、立花真仁、杉浦久敏、八重樫伸生、一ノ瀬正和 組織学的に診断された卵管サルコイドーシスの 1 例 第 36 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 東京医科大学 M&D タワー(東京都文京区) 2016 年 10 月 8 日

蒲生俊一、玉田 勉、村松聡士、村上康司、奈良正之、杉浦久敏、一ノ瀬正和 当院呼吸器内科外来で全身性サルコイドーシスのフォロー中、寛解後に増悪を認めた症例の臨床的検討 第 36 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 東京医科歯科大学 M&D タワー(東京都文京区) 2016 年 10 月 8 日

村松聡士、玉田 勉、奈良正之、蒲生俊一、杉浦久敏、一ノ瀬正和 メタボロミクス解析を用いたサルコイドーシス新規バイオマーカーの検索 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 国立京都国際会館(京都市) 2016 年 4 月 8 日

村松聡士、玉田 勉、奈良正之、蒲生俊一、杉浦久敏、一ノ瀬正和 中枢性尿崩症を合併したサルコイドーシス 3 例の検討 第 35 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 ホテルエルセラーン大阪(大阪市) 2015 年 11 月 8 日

蒲生俊一、玉田 勉、村松聡士、奈良正之、杉浦久敏、一ノ瀬正和 当院外来通院中に心臓病変が顕在化した心サルコイドーシス症例の臨床的検討 第 35 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 ホテルエルセラーン大阪(大阪市) 2015 年 11 月 8 日

蒲生 俊一 (GAMO SYUNICHI)  
東北大学・大学病院・医員

有竹 秀美 (ARITAKE HIDEMI)  
東北大学・医学系研究科・大学院生

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村松 聡士 (MURAMATSU SOSHI)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：30732549

### (2) 研究分担者

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)  
東北大学・大学病院・講師  
研究者番号：80396473

奈良 正之 (NARA MASAYUKI)  
東北大学・大学病院・特任教授  
研究者番号：70374999

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

三枝 大輔 (SAIGUSA DAISUKE)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク  
機構・講師  
研究者番号：90545237

村上 康司 (MURAKAMI KOJI)  
東北大学・大学病院・助教