

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05080

研究課題名(和文)キラルアミノ酸メタボロミクスを基盤とする腎不全の低侵襲早期診断法開発

研究課題名(英文)Early and minimally invasive diagnosis of kidney failure using chiral amino acid metabolomics

研究代表者

濱瀬 健司 (Kenji, Hamase)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10284522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全の早期・低侵襲診断を行うため、「三次元LC/LC/MS分析システム」および「三次元LC/LC/LCシステム」に加え、「LC/LC/MS/MS四次元分析システム」を開発した。分析対象は様々なキラルアミノ酸および類縁化合物(ヒドロキシ酸、ペプチド)に焦点を当て、ヒト臨床検体での正確な高感度分析を可能とする分析システムとした。ヒト慢性腎不全コホートサンプルを用いキラルアミノ酸のプロファイリングを行った結果、従来の二次元HPLC分析法では定量困難であった軽度腎不全検体においても良好にキラルアミノ酸分析が可能であり、早期診断に極めて有用であるという知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎不全は様々な原因で腎機能が低下した状態である。罹患人口は増加の一途をたどり、予備軍を含めた慢性腎不全患者数は日本で2000万人と推定されている。腎不全は原因疾患、病変部位共に多岐に亘るが、臨床症状が類似する場合もあり、確定診断・鑑別には腎生検が必要とされる。また、治療や予防の観点から軽度腎不全での診断法開発が切望されている。本研究では高い選択性を有する血中キラルアミノ酸分析システムを開発し、実際の腎不全検体を用いて早期の低侵襲診断を可能とした。この研究成果は、腎不全罹患者の生涯QOL改善に貢献するものであり、社会的有用性が高い。

研究成果の概要(英文)：For the early and minimally invasive diagnosis of kidney failure, LC/LC/MS three-dimensional system, LC/LC/LC three-dimensional system and LC/LC/MS/MS four-dimensional analysis system have been developed. As the analytes, various chiral amino acids, hydroxy acids and peptides were selected, and the analytical systems were designed using the real clinical samples. Using the human plasma with chronic kidney diseases, the chiral amino acids were analyzed. As a result, the present system could be applicable to all samples including the patients with high eGFR, indicating that the proposed method is effective for the early stage diagnosis of CKD.

研究分野：物理系薬学

キーワード：分析化学 メタボロミクス 光学分割 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎不全は様々な原因で腎臓機能が低下した状態であり、罹患人口は増加の一途をたどっている。日本のみに着目しても末期腎不全で腎代替療法（透析）を受ける患者数は 30 万人、予備軍を含めると慢性腎不全患者数は 2000 万人と推定されている。腎不全は原因疾患（糖尿病、高血圧、免疫疾患など）、病変部位（糸球体、尿細管など）ともに多岐に亘るが、臨床症状が類似する場合もあり、確定診断・鑑別には腎生検が必要とされる。しかし腎生検は高い臓器侵襲性のために検査による症状増悪リスクが無視できないことに加え、合併症の有無や症状の進行度により、また既に片腎である患者など、腎生検が実施出来ない症例も多い。一方で、腎不全は原因が特定されると治療が著効を示し、腎代替療法への移行を防止できる場合も多く、診断が治療に直結する疾患である。従って、侵襲性が低く、軽症期、発症早期から正確な鑑別を可能とする鋭敏な新規診断法の開発が切望されている。

現在、腎不全の低侵襲バイオマーカーとしてはクレアチニンやシスタチン C、尿タンパク質などが利用されるが、早期の腎不全検出感度が低く、原因疾患の特定能力も十分ではない。一方で最近、分析技術の進歩に伴って様々な D-アミノ酸が哺乳類体内に存在することが示され、生理的意義やバイオマーカーとしての有用性が着目されている（Science 325, 1505 (2009)）。応募者はこれまでの研究で、血中・尿中のキラルアミノ酸分析により腎不全時に数倍から数百倍の増減を示す鋭敏な指標を見出した（腎不全の早期診断マーカー、特許 5740523 号）。そこで今回、キラルアミノ酸分析を切り口として腎不全の低侵襲早期診断法を開発することで罹患者の生涯 QOL を大きく改善できると考え、本研究の申請を行った。

2. 研究の目的

腎不全の低侵襲早期診断法として、血中および尿中キラルアミノ酸プロファイリングを利用した方法を開発する。本研究は、アミノ酸の D 体と L 体を識別するキラルアミノ酸メタボロミクスにより、腎不全の低侵襲・早期診断を行う世界で初めての試みである。血中および尿中のキラルアミノ酸プロファイリングによる腎不全診断は、応募者のこれまでの特許技術（特許 5740523 号、特許 5639890 号、特許 4291628 号など）を駆使しており、独創性は極めて高い。本研究の達成により、臓器侵襲性の高い腎生検を行うことなく、腎不全の早期鑑別・診断が可能となると期待される。腎不全は早期に原因疾患が特定されれば、適切な治療介入による著効が期待でき、多くの罹患者の生涯 QOL 向上に貢献できる。

3. 研究の方法

腎不全で顕著な含量変化を示すキラルアミノ酸を対象として、平成 28 年度に「腎不全特化型キラルアミノ酸迅速分析法」を開発した。平成 28-30 年度にかけて、本法を用いて様々なモデル動物の血液、尿におけるキラルアミノ酸プロファイリングを行い、新規診断指標を探索すると共に、更なる分析法の選択性向上を検討した。併せて平成 29-30 年度を中心にヒト臨床試料の分析を進め、新規診断マーカーの確立を行った。

腎不全特化型キラルアミノ酸迅速分析法の開発

腎不全関連キラルアミノ酸として、予備試験で D 体、L 体（またはその比率）が血中・尿中で顕著な含量変化を示したセリン、アラニン、プロリン、アスパラギンに焦点を絞り、多数の臨床検体分析を可能とする迅速分析システムを開発した。分析法としては LC での二次元分離と質量での分離を組み合わせた三次元 LC/LC/MS システムとし、選択性の低下を招くことなく迅速化を達成した。一次元目には水系移動相で高分離能を示すキャピラリーモノリス ODS カラムを作製・利用し、二次元目にはオリジナルデザインの高性能セミマイクロ光学分割カラム（特願 2013-556504）を用い、実試料中での高選択的迅速分析を実現した。

三次元 LC/LC/LC 分析システムおよび四次元 LC/LC/MS/MS システムの開発

平成 28 年度に三次元 LC/LC/MS システムを開発し、実際の臨床検体におけるキラルアミノ酸分析を実施した。この中で、年齢、性別、重症度、原因疾患の異なる多数の患者検体を分析するためには、更なる選択性・検出感度の向上が期待されたため、逆相分離および光学分割に加えて、陰イオン交換モードなどを有する LC/LC/LC システムを開発した。また二次元 LC システムに MS/MS を検出に利用する四次元システムの開発も併せて行った。

ヒト腎不全検体におけるキラルアミノ酸分析

収集したヒト臨床検体について、従来の腎バイオマーカー解析により、腎不全の進行度が特定された検体を用いてキラルアミノ酸のプロファイリングを行った。本研究は腎不全を低侵襲かつ早期に診断し、一刻も早い原因特定から治療に結びつけることを目標としている。そのため、新規分析装置の設計・開発、疾病モデルマウスおよびヒト臨床試料を用いる検討など幅広い分野が含まれる。そこで、分析化学、腎臓内科、心・循環器内科、機器開発の専門家を結集した体制で研究を遂行した。

4．研究成果

平成 28 年度は腎不全特化型のキラルアミノ酸迅速分析法としてアスパラギン、アラニン、セリン、プロリンを対象とした迅速分析システムを構築した。一次元目には低圧力で高流速分析を可能とするオリジナルデザインのモノリス型 ODS カラム（内径 0.53 mm、全長 750 mm）を利用し、二次元目にもオリジナルデザインの KSAACSP-001S カラム（内径 1.5 mm、全長 250 mm）を使用した。その結果、全ての対象アミノ酸鏡像異性体が分離係数 1.17 以上で 20 分以内にベースライン分離された。また、二次元 LC 分離後に四重極質量分析器を接続して LC/LC/MS 分析を行った結果、実試料マトリクスにおいても殆ど妨害成分が存在しない三次元分析が達成された。質量分析においては、直接定量の再現性に課題が認められたが、%D の再現性は RSD2%程度であり、実試料にも良好に適用可能であった。

また、動物モデル尿中の D-アミノ酸由来解析として、SPF マウス及び無菌マウスの尿分析を行った。その結果、コントロールマウスの尿中ではいずれのアミノ酸も高濃度で D 体が確認され、アラニンでは %D ($D/(D+L) \times 100$)=14%、アスパラギンでは 77%、プロリンでは 26%、セリンでは 56%であった。一方無菌マウス尿中ではそれぞれ 0.6%、24%、17%、26%であり、D-アラニンは腸内細菌に由来し、D-アスパラギン、プロリン、セリンは他の生成経路が存在することが示唆された。

平成 29 年度には絶対定量三次元システムとして、予備検討で顕著な含量変化を示したキラルアミノ酸であるセリン、アラニン、プロリン、アスパラギンに焦点を絞り、臨床検体での正確な高感度分析を可能とする LC/LC/LC 三次元分析システムを開発した。一次元目には水系移動相での逆相分離を行うため、微粒子充填型の逆相カラムとして KSAARP（内径 1.5 mm、全長 500 mm）を作製・利用した。二次元目には陰イオン交換型高分離能カラムとして KSAAX-002（内径 1.5 mm、全長 150 mm）を作製・利用した。三次元目ではオリジナルデザインの高性能セミクロ光学分割カラムとして KSAACSP-001S（内径 1.5 mm、全長 250 mm）を用いた。検出には蛍光検出器を用いており、極めて高い選択性と定量性が両立された絶対定量三次元 HPLC システムの構築に成功した。

本三次元 HPLC システムによりヒト臨床検体として血漿、尿の分析を行った結果、血漿からは 0.4%の D-Asn、1.7%の D-Ser、1.2%の D-Ala、0.1%の D-Pro が夾雑成分の影響を受けることなく、明瞭に認められた。また尿中では 21.4%の D-Asn、35.2%の D-Ser、28.9%の D-Ala が認められた。本法を慢性腎不全患者の血漿分析に適用した結果、4 種の D-アミノ酸はいずれも eGFR と関連した含量変化を示し、特に D-Ser および D-Asn では極めて良い結果が得られた。

平成 28、29 年度までに進めてきたセリン、アラニン、プロリン、アスパラギンの「三次元 LC/LC/MS 分析システム」および「三次元 LC/LC/LC」システム開発に加え、平成 30 年度は、腎不全におけるキラルアミノ酸プロファイリングの全体像を明らかにするため、様々な関連化合物分析装置開発を進めると共に、臨床検体を分析し病態との関連解明を進めた。

セリン、アラニン、プロリン、アスパラギンに加え、様々なキラルアミノ酸、および類縁化合物（ヒドロキシ酸、ペプチドなど）に焦点を当て、ヒト臨床検体での正確な高感度分析を可能とする LC/LC/LC 三次元分析システム、LC/LC/MS/MS 四次元分析システムを開発した。分析法としては 3 種の分離モードを組み合わせた三次元 LC/LC/LC システム、または 2 種の分離を組み合わせた LC に MS/MS を接続した四次元法とし、高い選択性と定量性の両立を図った。一次元目は逆相分離とし、二次元目には陰イオン交換型高分離能カラム、または様々な相互作用を併せ持つミックスモードカラムをデザイン・作製して利用した。三次元目では高性能セミクロ光学分割カラムのデザインを継続して行った。四次元法は、逆相とキラル分割を組み合わせた二次元 LC と二次元質量分離を組み合わせたシステムを開発した。

実際のヒト腎不全臨床検体におけるキラルアミノ酸分析として、慢性腎不全コホートサンプルを用いキラルアミノ酸のプロファイリングを行った。その結果、従来の二次元 HPLC 分析法では定量困難であった軽度腎不全検体においても良好にキラルアミノ酸分析が可能であり、早期診断に極めて有用であるという知見を得た。また、キラルアミノ酸のみではなく、乳酸、ヒドロキシ酪酸、ペプチドなど様々な代謝関連化合物についても三次元 LC/LC/LC 分析法の構築を行った。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Chiharu ISHII, Tetsuya MIYAMOTO, Shoto ISHIGO, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Hiroshi

HOMMA, Tadashi UEDA, Kenji HAMASE, Two-dimensional HPLC-MS/MS determination of multiple D-amino acid residues in the proteins stored under various pH conditions, *Chromatography*, 38, 65-72 (2017), DOI:10.15583/jpchrom.2017.009

Chin-Ling HSIEH, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Kenji HAMASE, Enantioselective and simultaneous determination of lactate and 3-hydroxybutyrate in human plasma and urine using a narrowbore online two-dimensional HPLC system, *Journal of Separation Science*, 41, 1298-1306 (2018), DOI:10.1002/jssc.201701283

Nutchaya SEREEKITTIKUL, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Aogu FURUSHO, Roland REISCHL, Masashi MITA, Akira FUJII, Kazunori HASHIGUCHI, Masanobu NAGANO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Multi-dimensional HPLC analysis of serine containing chiral dipeptides in Japanese traditional amber rice vinegar, *Chromatography*, 39, 59-66 (2018), DOI:10.15583/jpchrom.2018.002

Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Development of a highly-sensitive two-dimensional HPLC system with narrowbore reversed-phase and microbore enantioselective columns and application to the chiral amino acid analysis of the mammalian brain, *Chromatography*, 39, 83-90 (2018), DOI:10.15583/jpchrom.2018.007

Chiharu ISHII, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Kenji HAMASE, Development of an online two-dimensional high-performance liquid chromatographic system in combination with tandem mass spectrometric detection for enantiomeric analysis of free amino acids in human physiological fluid, *Journal of Chromatography A*, 1570, 91-98 (2018), DOI:10.1016/j.chroma.2018.07.076

Chin-Ling HSIEH, Po-Yeh LIN, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Kenji HAMASE, Development of a three-dimensional HPLC system for the simultaneous determination of lactate and 3-hydroxybutyrate enantiomers in mammalian urine, *Chromatography*, 40, 25-32 (2019), DOI:10.15583/jpchrom.2018.021

〔学会発表〕(計 2 2 件)

Kenji HAMASE, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid targeted metabolomics as a new strategy for biomarker screening and designing functional foods/beverages, 44th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (San Francisco, CA, USA, 2016 June 23), P55-56.

Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Yu SATO, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Enantioselective 2D-HPLC determination of citrulline and ornithine in the urine of D-amino acid oxidase deficient mice, 44th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (San Francisco, CA, USA, 2016 June 21), P105.

浜瀬健司, 多次元 HPLC を用いるキラルアミノ酸メタボロミクスによる創薬・診断・機能性プロダクト開発, 第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, (京都, 2016 年 9 月 3 日), 講演要旨集, P45.

浜瀬健司, 古賀鈴依子, 三次百合香, 三田真史, 奈良岡 浩, 多次元分析による生体・食品・宇宙試料中のキラルアミノ酸精密定量, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, (高知, 2016 年 9 月 14 日), 講演要旨集, P41.

浜瀬健司, キラルアミノ酸分析が拓く未来の医療, 第 47 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, (豊橋, 2016 年 11 月 5 日), 講演要旨集, P42.

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid analysis: New frontier of drug discovery and diagnosis, 27th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (Guangzhou, China, 2016 November 14), P50.

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Hiroshi NARAOKA,

Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolomics using multi-dimensional HPLC, XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry, (Taipei, Taiwan, 2016 November 24), P62.

Kenji HAMASE, Multi-dimensional HPLC analysis of chiral amino acids for drug discovery and diagnosis, The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, (Bangkok, Thailand, 2017 March 2) P61.

浜瀬健司, 多次元 HPLC によるキラルアミノ酸分析と医療応用, 第 77 回分析化学討論会 (京都, 2017 年 5 月 28 日), 講演要旨集, P42.

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Three-dimensional HPLC analysis of amino acid enantiomers in complicated real world samples, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Prague, Czech Republic, 2017 June 20), P55.

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Jen-Ai LEE, Wolfgang LINDNER, Multi-dimensional HPLC analysis of D-amino acids and related compounds in complicated biological matrices and its clinical applications, The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research (Varese, Italy, 2017 July 11), P14.

Nutchaya SEREEKITTIKUL, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Roland REISCHL, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Development of the multi-dimensional HPLC system for serine containing chiral dipeptides and application to clinical/food samples, 第 35 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (朝倉, 2017 年 7 月 28 日), 講演要旨集, P54.

浜瀬健司, 多次元 HPLC によるキラルアミノ酸・ヒドロキシ酸分析とアプリケーション, 日本分析化学会第 66 年会 (東京, 2017 年 9 月 10 日), 講演要旨集, P118.

Nutchaya SEREEKITTIKUL, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Roland REISCHL, Masashi MITA, Masanobu NAGANO, Tomomi IDE, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Multi-dimensional HPLC analysis of serine containing chiral dipeptides in human physiological fluids and fermented products, The 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Jeju, Korea, 2017 November 7), PT019.

Kenji HAMASE, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Hiroshi NARAOKA, Wolfgang LINDNER, Multi-dimensional chiral HPLC analysis of amino acids in clinical samples and extraterrestrial materials, The 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Jeju, Korea, 2017 November 9), K39.

Kenji HAMASE, Multi-dimensional HPLC with fluorescence detection as a promising method for trace analysis of chiral amino acids and hydroxy acids in clinical, food and extraterrestrial samples, XVIII International Symposium on Luminescence Spectrometry (Brest, France, 2018 June 20), P14.

Kenji HAMASE, Multi-dimensional chiral HPLC: A promising approach to expand the frontier of amino acid, peptide and protein research, 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences (Dalian, China, July 12), P53.

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Chin-Ling HSIEH, Nutchaya SEREEKITTIKUL, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Wolfgang LINDNER, Three-dimensional chiral HPLC analysis of amino acids and related compounds in complex biological matrices including human clinical samples, 47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Washington, DC, USA, 2018 August 2), P71.

Kenji HAMASE, Chiharu ISHII, Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Masanobu NAGANO, Tomomi IDE, Tomonori KIMURA, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolomics studies using two/three-dimensional HPLC for the screening of new biomarkers and designing functional foods/beverages, The 11th International Symposium on Drug Analysis & The 29th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Leuven, Belgium, 2018 September 10), 03-3.

Kenji HAMASE, Chiral amino acid analysis using multi-dimensional HPLC: A new frontier

of the amino acid and protein research, 15th Conference of the International Society of Tryptophan Research (Hikone, 2018 September 20), P67.

⑪ Kenji HAMASE, Enantioselective multi-dimensional HPLC analysis of amino acids and related compounds in complex matrices; Application to food and extraterrestrial samples, 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences (IAMP35) and CU-MPU International Collaborative Research Conference (Bangkok, Thailand, 2019 March 8), P64.

⑫ Kenji HAMASE, Chiral amino acid analysis using 2D/3D-HPLC for the screening of functional molecules and biomarkers, 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (Kobe, 2019 March 31), S90.

〔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〕

ホームページ等

<http://soyaku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：猪阪 善隆

ローマ字氏名：Isaka Yoshitaka

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00379166

研究分担者氏名：井手 友美

ローマ字氏名：Ide Tomomi

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90380625

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：三田 真史

ローマ字氏名：Mita Masashi

研究協力者氏名：Wolfgang Lindner

ローマ字氏名：Wolfgang Lindner

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。