

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390263

研究課題名（和文）メタボローム解析による新規 AKI バイオマーカーの網羅的探索と検査薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel biomarkers for acute kidney disease by metabolome analysis

研究代表者

松尾 清一 (MATSUO SEICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70190410

研究成果の概要（和文）：本研究では、各種腎疾患の尿サンプルをメタボローム解析し腎疾患毎の基本的メタボロームプロファイルの取得に成功した。代謝物毎に AKI 群と非 AKI 群を比較することで、AKI 群特異的な濃度変化を示す代謝物質群を新規 AKI 鑑別用バイオマーカー候補代謝物群として抽出できた。さらに、腹部大動脈瘤置換術時に術前から術後 ICU 退室時まで経時的に連続採取した AKI 発症群および非発症群の尿サンプルから AKI 発症群および非発症群の各尿中メタボロームプロファイルの取得に成功した。各代謝物濃度の時系列変化パターンを比較することで術後に AKI を発症する可能性の高い患者を手術前・途中でスクリーニングすることを可能にする新規早期診断・予後推定尿中バイオマーカー候補代謝物群を抽出できた。これら各種バイオマーカー候補代謝物群を発見できたことで、AKI 診断薬の開発が大幅に推進しただけでなく、AKI の病態メカニズムを解明するうえでも非常に重要な情報が得られた。

研究成果の概要（英文）： We conducted the metabolome analyses of the urine samples from various renal diseases, and succeeded in obtaining the fundamentally metabolome profile for every renal disease. By comparing each metabolite in AKI group with that in non-AKI group, we were able to acquire a group of biomarker candidates which showed specific concentrations in AKI patients. Using series of urine samples taken from patients who underwent abdominal-aortic-aneurysm replacement surgery before, during and after the operation, until the time of leaving from postoperative ICU, I succeeded in getting urinary metabolome profile of AKI group and non-AKI group. Moreover, compared the time-series variation of each metabolite concentration, I was able to acquire the novel urinary biomarker candidate metabolites group which make it possible to detect AKI early and to extrapolate the prognosis of renal function before and/or during the operation. Information on these various biomarker candidate metabolites groups gives us not only the target substances for the AKI diagnostics but also a key to understanding the mechanisms of AKI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：メタボローム、バイオマーカー、急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

近年、急性腎障害(AKI)による急激な腎機能の低下は尿細管上皮細胞の先行した機能的・構造的障害に起因していることが明らかとなり、より早期に腎障害を予測・診断して、早期治療介入することの重要性が強調されるようになった。しかし、血清クレアチニン値の上昇に基づく現在の AKI 診断基準では、診断時点ですでに治療介入のタイミングを逸していることが多く、ICU 領域での AKI による死亡率は 50%以上に達しており、臨床現場では早期治療介入を可能にする迅速診断薬の開発が急務となっている。

申請者らは、様々なトランスポーターやチャンネルを有して盛んに物質輸送を行う尿細管上皮細胞の研究には、研究アプローチとして全代謝物一斉解析(メタボローム解析)が有利であると判断し、本研究では従来の研究手法に加えてメタボローム解析法の観点から AKI の病態メカニズムの解明、ミッドカインの機能解析、および AKI バイオマーカーの探索に取り組む。

本研究は下記の 1)~4)の研究分野に位置付けられ、申請者らは 1)~3)の研究分野において下記の業績により世界をリードしている。各分野における申請者の研究経過は下記の通り。

1) AKI の病態メカニズム解析: AKI に至る主原因として腎虚血障害、薬剤性腎障害および敗血症などが引き起こす尿細管間質障害が知られているが、申請者はこれまで AKI の病態メカニズムについて、遺伝子およびタンパク質レベルでのアプローチを行い、ヘパリン結合型成長因子であるミッドカインが尿細管間質障害の Common Pathway で重要な役割を担っていること(Sato W. et al., NDT, 2002)、腎虚血障害では近位尿細管にミッドカインが発現亢進すること(Sato W. et al., JI, 2001)、尿細管局所に発現するミッドカインは AKI の治療標的分子の一つであること(Sato W. et al., KI, 2005)を発見し、抗ミッドカイン siRNA 療法を確立した(Takei Y. et al., MolCancerTher, 2008)。

2) AKI の診断・早期治療介入のためのバイオマーカー探索: 申請者は、尿中ミッドカインが AKI の鑑別診断および早期診断に有用なバイオマーカーであること発見し(Hayashi H. et al., ERA/EDTA, 2008)特許を申請した(P08014, 国際特許分類 G01N 33-48)。AKI のバイオマーカーとしてこれまでに NGAL、IL-18、KIM-1 などのペプチド(タンパク質)が報告されているが、代謝物の AKI バイオマーカーは見つかっていない。

3) メタボローム解析: オミクス解析法のひとつであるメタボローム解析は、生体試料中

の全代謝物(メタボローム)の変化を一斉測定する網羅的解析手法である。本研究分担者は、世界で初めてキャピラリー電気泳動装置+質量分析機(CE+MS)を用いて細胞内の全イオン性代謝物(~1k Da)を網羅的かつ高速に直接定量する手法を開発し(Soga et al., 2003)、薬剤性急性肝炎の新規バイオマーカーの発見(Soga et al., JBC, 2006)など良好な結果を得ている。

4) バイオマーカーを用いた臨床用診断ツールの開発: 臨床用診断ツールの開発に共通する問題点として、検出系デバイスの技術革新(抗体やアプタマー、微細加工や集積化)が進んだ一方で、診断ツールのコンテンツとなるバイオマーカーの不足が開発のボトルネックとなっている。

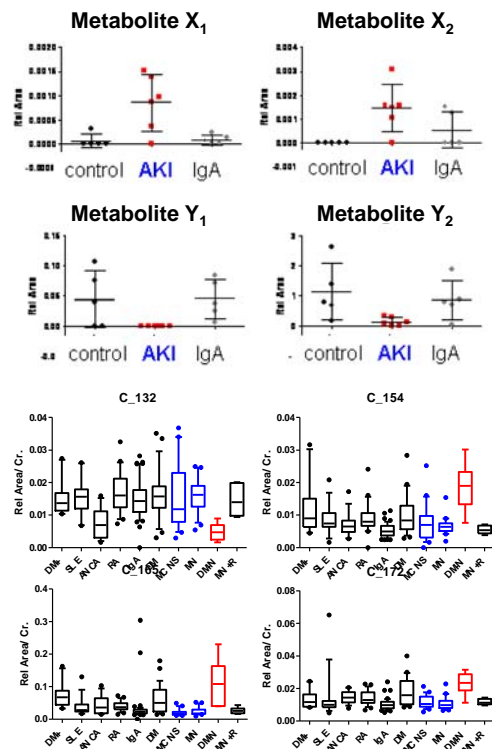


図 1. AKI 鑑別診断用バイオマーカー候補物質の探索結果の一例。

2. 研究の目的

申請者らは様々なトランスポーターやチャンネルを有して盛んに物質輸送を行う尿細管上皮細胞の機能的・構造的障害に由来する AKI の研究には、メタボローム解析法が最適のアプローチ法の一つであると考え、AKI の発症を迅速に検出するためのバイオ

マーカーの開発を最終目的に据え、AKI 患者および非 AKI 患者の尿中メタボローム解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、まず、尿検体を用いた CE-MS によるメタボローム解析を実施するために、尿の前処理方法および測定方法の最適化を行った。続いて、研究計画段階では尿管上皮細胞の培養細胞を用いた in vitro 系で急性腎障害モデル細胞を再現して、このときの培養細胞におけるメタボローム解析を行うことを計画していたが、尿管上皮細胞培養細胞のみを用いた in vitro 実験系では実際の急性腎障害をミミックできそうにないことが判り、in vitro 実験系から AKI バイオマーカーを探索する部分を取りやめ、実際の患者検体のみで AKI バイオマーカーを探索することに変更した。名古屋大学医学部附属病院手術室および集中治療室において、腹部大動脈置換術など AKI を起こす可能性が高い手術を受けた患者について、術前から術後にかけて経時的に尿をサンプリングし、AKI の発症の有無を確認後に、各サンプルを AKI 発症群および非 AKI 発症群に分類した。各サンプルは、サンプリング後-80℃で直ちに凍結保存し、慶応大学先端生命科学研究所に輸送して CE-MS によるメタボローム解析に供した。得られた尿メタボロームプロファイルに基づいて考察を行い、実験①AKI を鑑別するためのバイオマーカー候補物質の探索、および実験②AKI の発症を予測するためのバイオマーカー候補物質の探索に取り組み、将来的に AKI 診断薬の開発に資する基盤情報の収集に努めた。

4. 研究成果

実験①AKI 鑑別用バイオマーカー候補物質の探索：申請者がこれまでの研究過程で採取し凍結保存していた各種腎疾患 {AKI (虚血、造影剤腎症、抗ガン剤、敗血症)、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、IgA 腎症、膜性腎症、SLE、等} および健常人の尿サンプルコレクションから、各腎疾患につき 5~20 例を選択してメタボローム解析を行ったところ、おおよそ 4000~5000 ピークのうち 200~300 代謝物を、腎疾患毎の基本的メタボロームプロファイルとして取得に成功した。得られたデータに基づいて個々の代謝物毎に AKI 群と非 AKI 群を比較して AKI 群に特異的な濃度変化をあぶり出し、AKI 群特異的な濃度を示す代謝物質群を新規 AKI 鑑別用バイオマーカー候補代謝物質群として抽出することができた。

実験②AKI 発症予測用バイオマーカー候補物質の探索：申請者がこれまでの研究過程で採取し凍結保存していた腹部大動脈置換術時に術前から術後 ICU 退室時まで経時的に

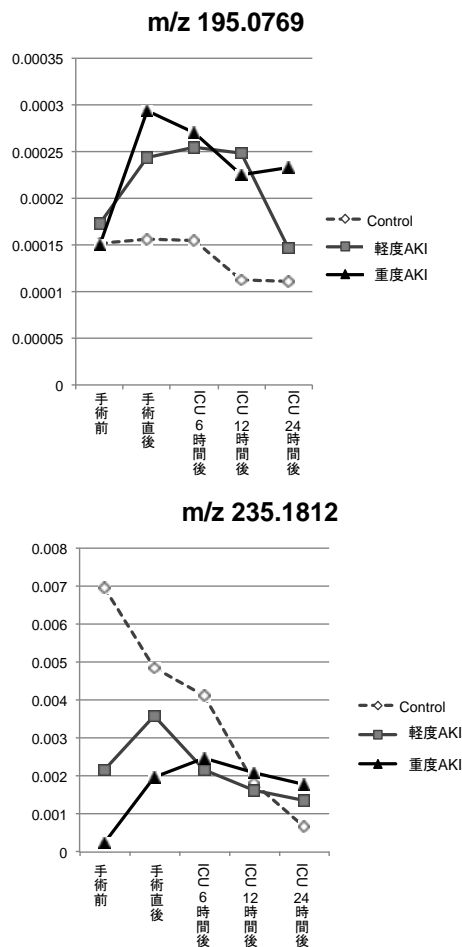


図 3. 術後 AKI 発症予測バイオマーカー候補代謝物の例. 代謝物 (m/z195.0769) は術後時に濃度が高ければ AKI を発症する高い可能性を示唆し、代謝物 (m/z235.1812) は術前時の濃度が低ければ術後に AKI を起こす高い可能性を示唆している。

連続採取した AKI 発症群および非発症群の尿サンプル (両群 5~10 人分) に加えて、新規に採取した同様のサンプル (AKI+非 AKI : 50 症例以上) を用いて、AKI 発症群および非発症群の各尿中メタボロームプロファイルの取得に成功した。得られたメタボロームプロファイルデータを術後に AKI を発症しなかった群 (AKI 非発症群)、術後に軽度 AKI を発症した群 (軽度 AKI 発症群) および術後に重度 AKI を発症した群 (重度 AKI 発症群) に分けて各代謝物濃度の時系列変化を比較して、術後に AKI を発症する可能性の高い患者を手術前・途中でスクリーニングすることを可能にする新規早期診断・予後推定用尿中バイオマーカー候補代謝物群を抽出することができ

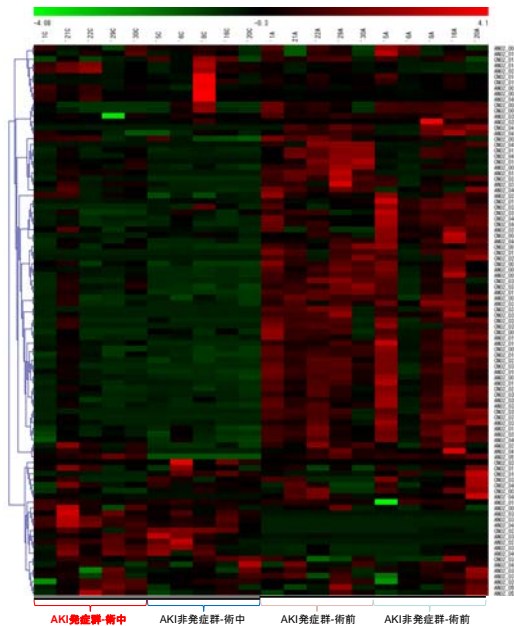


図 2. 術後 AKI 発症群と非発症群とのメタボロームプロファイル比較の一例

た。本研究の結果から、AKI 診断用バイオマーカーを従来のタンパク質レベルとは異なり代謝物レベルで開発できることが強く示唆された。本研究で標的にした約 1kDa 以下の低分子代謝物はタンパク質に比べて保存性もよく、尿中に含まれる種類もタンパク質に比べて遙かに多いことから、より扱いやすく、かつ、より分解能の高い診断用バイオマーカーが開発できる可能性が高い。実験①および②において抽出できた各種バイオマーカー候補代謝物群は、AKI 診断薬の標的物質となるだけでなく、AKI の病態メカニズムを解明するうえでも非常に重要な情報であり、今後の研究の発展や臨床での実用化を踏まえると、この時点で知財化を急ぐべきであると判断し、本研究期間終了時においては、別の検体を用いたバリデーションスタディを追加してバイオマーカーとしての信頼性向上を進めるとともに、各バイオマーカー候補代謝物群の知財化に取り組んで、いち早い AKI 診断方法の確立を目指して現在研究を継続中である。

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 3 件)

1. Mizuno M, Ito Y, Hayasaki T, Suzuki Y, Hiramatsu H, Toda S, Mizuno T, Tatematsu M, Ozaki T, Yasuda Y, Sato W, Tsuboi N, Ito I, Maruyama S, Imai E, Matsuo S. A case of acute renal failure caused by cholesterol embolization after carotid artery stenting that was improved by peritoneal dialysis. *Am J Nephrol.* 2011;34(3):249-55. 査読有
2. Yuzawa Y, Sato W, Masuda T, Hamada Y, Tatematsu M, Yasuda Y, Ozaki T, Ito I, Mizuno M, Maruyama S, Ito Y, Matsuo S. Acute kidney injury presenting a feature of leukemic infiltration during therapy for chronic myelogenous leukemia. *Intern Med.* 2010;49(12):1139-42. 査読有
3. Kato N, Yuzawa Y, Kosugi T, Hobo A, Sato W, Miwa Y, Sakamoto K, Matsuo S, Kadomatsu K. The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jul;20(7):1565-76. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Shin'ichi Akiyama, CE-MS based time-course metabolic profiling in plasma and dialysate with hemodialysis, 国際尿毒症学会, 2011/5/12, 名古屋国際会議場
2. Hibiki Shinjo, A Comparison of the Acute Kidney Injury Network and Kidney Disease: Improving Global Outcomes Criteria for Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients, ASN, November 11, Philadelphia, PA
3. 新城 響, 当院集中治療室 (ICU) における急性腎障害 (AKI) について, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011. 6. 15, 横浜
4. 林 宏樹, 急性期の腎・肺相関 (第2報) — AKIがALI/ARDS 症例の肺胞局所に及ぼす影響の検討, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011. 6. 15, 横浜
5. 丸山 彰一, 厚労省難治性疾患克服研究事業: 進行性腎障害に関する調査研究, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011. 6. 16, 横浜

6. 湯沢 由紀夫, 肺腎連関/midkine, 第53回日本腎臓学会学術総会, 2010.6.17, 神戸ポートピアホテル
7. 湯澤 由紀夫, AKIの新規バイオマーカー, 第53回日本腎臓学会学術総会, 2010.6.18, 神戸ポートピアホテル
8. 林宏樹, 一急性期の腎・肺相関— 急性腎障害(AKI)はAcute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome(ALI/ARDS)の予後規定因子である, 第10回腎不全病態治療研究会, 東京
9. 林 宏樹, 新規AKIバイオマーカー, 尿中midkine(MK)の有用性: NGAL, IL-18, NAGとの比較, 第52回日本腎臓学会学術総会, 2009.6.3-5, 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 70190410

(2) 研究分担者

湯澤 由紀夫 (YUZAWA YUKIO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 00191479

曾我 朋義 (SOGA TOMOYOSHI)
慶應義塾大学・環境情報学部・教授
研究者番号: 60338217

秋山 真一 (AKIYAMA SHINICHI)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号: 20500010
(H23 追加)

(3) 連携研究者

なし