

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461217

研究課題名(和文)メタボローム解析を用いた腎疾患における新規診断法の開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnosis method for renal disease using metabolome analysis

## 研究代表者

尾崎 武徳(OZAKI, Takenori)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：10452195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎生検で確定診断されたネフローゼ症候群上位7疾患(微小変化型ネフローゼ症候群、膜性腎症、糖尿病性腎症、巣状分節性糸球体硬化症、アミロイド腎症、ループス腎炎、IgA腎症)274例の尿検体を用いてメタボローム解析を行い、診断を予測する代謝産物を得た。続いて、新規120例でvalidationを行い同様の結果を得た。また、イヌリンクリアランスを測定した症例173例の血漿と尿検体の代謝産物の中で、GFRと関連する物質を得た。

研究成果の概要(英文)：We performed metabolome analyses using the urine specimen of 274 nephrotic syndrome patients with top 7 biopsy proven pathological diagnoses (minimal change nephrotic syndrome, membranous nephropathy, diabetic nephropathy, focal segmental glomerulosclerosis, amyloid nephropathy, lupus nephritis, and IgA nephropathy). Metabolites which can predict a diagnosis were obtained. We then performed validation study using other 120 cases, and got similar results. We also performed metabolome analyses using the plasma of 173 cases from patients who underwent the inulin clearance test, and I got the metabolites which are positively or negatively associated with decreased GFR.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：メタボローム 腎疾患 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

オミックス解析法の一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。本研究分担者の曾我は世界で初めてキャピラリー電気泳動装置と質量分析機を組み合わせた装置(CE-MS)を用いて細胞内の全イオン性代謝物(～1kDa)を網羅的かつ高速に直接定量する手法を開発し(Sofa 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。腎疾患においてはメタボローム解析手法を用いた研究の報告はまだ殆どなく、本研究のような1000例という大規模な臨床検体を用いた研究は世界でも初めての試みと思われる。

現在、腎炎やネフローゼ症候群などの腎疾患の診断には腎生検が必要であるが、腎生検は出血のリスクが高い。そのため、全身状態の悪い患者や高齢者、出血性素因のある患者、片腎の患者などでは腎生検ができないことも多く、診断や病態の把握が困難となり、十分な治療ができないことも多い。また、腎生検の出血リスクの高さから、糖尿病性腎症や腎硬化症において、通常腎生検は施行されずに、臨床的な推測で診断することが多い。以上のことから、腎生検を行わずに血液と尿から腎疾患の診断ができる新たな診断方法の開発は臨床的価値が非常に高いと思われる。

申請者らは、これまでに予備研究として約200例の臨床検体(尿検体)のメタボローム解析を試みた結果、疾患により代謝物プロファイルが異なることを明らかにしている。疾患特異的な代謝物を組み合わせることで、高い精度で各疾患の鑑別診断ができる可能性があることに着目し、検体数を大幅に増やすことにより更に精度の高い診断バイオマーカーの開発を目指している。また、疾患毎の代謝物プロファイルを詳細に検討することは病態解明にも繋がり、将来的には代謝物レベルでの制御による新しい治療法の開発にも寄与すると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究分担者が開発した極めて強力な生体分析技術であるCE-MSによるメタボローム解析(全代謝物一斉解析)技術を用いることにより、約1,000例のヒト臨床検体(血液・尿)を解析し、様々な腎疾患(腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症)の疾患特異的な代謝物バイオマーカーの開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、各腎疾患を鑑別するためのバイオマーカーとなる候補代謝物の検索を行い、続いて、候補代謝物のバイオマーカーとしての診断性能を検証するために約1,000例の腎生検にて診断されたヒト腎疾患検体(血液・尿)を用いて、メタボローム解析

を行った。各疾患毎に全代謝物を比較検討し、診断マーカーや治療ターゲットとなる候補代謝物の抽出を試みた。

本研究で利用したCE-MS(キャピラリー電気泳動装置付き質量分析計)によるメタボローム解析の測定原理を図1に示した。簡単に原理について概説すると、後述する前処理により水に可溶性成分を単離した測定検体をCE-MS装置にアプライすると、まず測定代謝物はその電荷に応じて電気泳動によりキャピラリー内を移動した後、キャピラリーの出口に接続したTOF型質量分析計によりそれらの分子量がmDaオーダーで計測される。同時に既知濃度の各代謝物の標品および内部標準物質を計測することで、各代謝物の定性と定量できる。陽イオン性代謝物ではキャピラリーの出口を陰極に、陰イオン性代謝物ではキャピラリーの出口を陽極にすることで、同じ装置を用いて陽イオン性および陰イオン性の代謝物を測定できる。おおよその測定時間は、一検体あたり30分間程度である。CE-MSによるメタボローム解析法は、水溶性低分子代謝物を網羅的かつ高速に測定する手技として有力な方法として認知されており、本研究では腎疾患患者の鑑別用バイオマーカーとなりうる血液および尿中の代謝物を探索する主要な方法として本測定法を採用した。

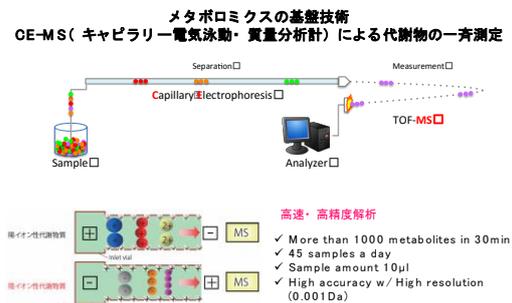


図1. CE-MSによるメタボローム解析

血液や尿に含まれる水溶性代謝物をCE-MS法により測定する場合の試料前処理法について説明する。図2には、血液、すなわち、血漿に含まれる水溶性代謝物を測定するための前処理法の概略を示した。代謝物は、物理的、化学的および細菌学的要因により変性しやすいため、分析試料の採取では迅速な抽出が求められる。本研究では、-80℃下で凍結保存していた血漿および尿検体を、測定時に解凍して、直ちにメタノールを添加して不活化し、さらに、クロロフォルムを加えて遠心処理し、分離した水相を分取して前処理済み検体とした。尿検体については、メタノール/クロロフォルムによる前処理を行わず、適宜希釈処理のみを行って測定に供した。

## Metabolite Extraction Procedure for Human Plasma

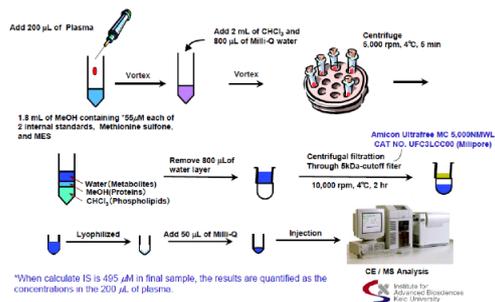


図 2. 血漿検体の前処理法

名古屋大学医学部附属病院および関連病院で腎生検を行った患者のうち、病理像および臨床像から確定診断された約 1000 症例を解析対象にした。これらの症例には、ネフローゼ症候群上位 7 疾患である膜性腎症、糖尿病性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、ループス腎炎、アミロイド腎症、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症が含まれている。各試料は、腎生検を施行する直前に採取し、採取後直ちに小分けにして、 $-80^{\circ}\text{C}$  下で保存していた。なお、血漿の調製では抗凝固剤として 2Na-EDTA を添加した後に混和してから遠心分離機を用いて血漿を採取した。尿検体は、保存の前処理として EDTA や Tris からなる保護剤を加えてから遠心分離して細胞成分を除去した。

これら約 1000 症例分の血液および尿検体を先述の CE-MS によるメタボローム解析で分析し、各検体のメタボロームプロファイルを集積したデータベースを作成した。

ネフローゼ症候群上位 7 疾患を鑑別するためのバイオマーカー候補代謝物を同定する解析プロセスでは、探索的解析と検証的解析を繰り返す戦略を採用した。すなわち、未知の候補代謝物を発見するための Discovery 群と発見した候補代謝物の診断性能を検証するための Validation 群に検体を二分してメタボローム解析を実施した。解析の一例では、下表の通り、Discovery 群として、膜性腎症 ( $n=78$ )、糖尿病性腎症 ( $n=29$ )、微小変化型ネフローゼ症候群 ( $n=74$ )、ループス腎炎 ( $n=27$ )、アミロイド腎症 ( $n=19$ )、巣状糸球体硬化症 ( $n=29$ )、および IgA 腎症 ( $n=18$ ) を用いて候補代謝物の同定作業を行い、Validation 群として、膜性腎症 ( $n=43$ )、糖尿病性腎症 ( $n=14$ )、微小変化型ネフローゼ症候群 ( $n=22$ )、ループス腎炎 ( $n=13$ )、アミロイド腎症 ( $n=8$ )、巣状糸球体硬化症 ( $n=10$ )、および IgA 腎症 ( $n=10$ ) を用いて先の探索的解析で同定した候補代謝物の鑑別性能の検証作業を行った。

また、尿中および血中の代謝物濃度は GFR によって変動することが予想される。これまで eGFR と尿中代謝物濃度との関連の検討は報告されているが、GFR 測定の gold standard であるイヌリンクリアランス (実測 GFR) と

の関連の検討の報告は無く、これについても検体を収集し解析を行った。

表 1. ネフローゼ症候群上位 7 疾患の検体リスト

疾患	検体数	年齢	性別 M/F	eGFR
MN	78	63.8 (37-81)	62/16	61.7 (9.8-88.5)
DN	29	57.5 (29-78)	22/7	35.2 (5.8-78.8)
MCNS	74	57.2 (26-82)	50/24	59.0 (14.1-89.3)
SLE	27	52.9 (27-80)	6/21	48.5 (6.4-82.7)
RA	19	71.0 (51-86)	15/4	45.0 (15.7-82.7)
FSGS	29	58.5 (32-78)	20/9	52.8 (16.7-81.9)
IgA	18	56.1 (27-79)	13/5	46.8 (5.4-90.0)
計	274			

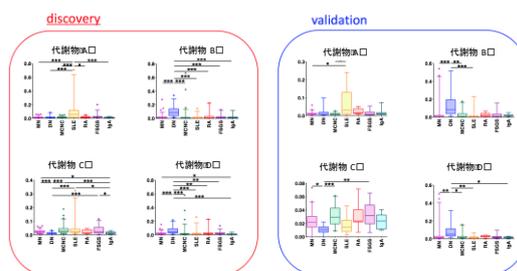
### validation

疾患	検体数	年齢	性別 M/F	eGFR
MN	43	70.3 (37-84)	23/20	56.3 (11.6-88.9)
DN	14	58.1 (29-82)	8/5 不明 <sup>1</sup>	39.9 (18.9-87.9)
MCNS	22	60.2 (17-86)	15/7	52.7 (9.8-88.8)
SLE	13	61.8 (37-80)	2/11	48.0 (5.4-75.3)
RA	8	72.9 (59-80)	4/4	45.4 (14.5-72.9)
FSGS	10	60.1 (23-79)	2/8	49.5 (6.8-82.2)
IgA	10	47.2 (25-81)	6/4	49.5 (21.9-79.7)
計	120			

## 4. 研究成果

本研究では、約 1000 症例分の腎生検時の血液および尿検体に含まれる全代謝物のメタボローム解析を実施し、世界でも前例を見ない規模での腎生検時の腎疾患別メタボロームプロファイルデータベースを構築した。

腎疾患別メタボロームプロファイルデータベースから抽出したネフローゼ症候群上位 7 疾患 (膜性腎症、糖尿病性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、ループス腎炎、アミロイド腎症、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症) のデータセットに対して、各種クラスタリング解析を行った結果、一つまたは複数の代謝物の組み合わせによって、ネフローゼ症候群の患者全体から先の 7 疾患の患者を鑑別できるバイオマーカー候補分子を複数同定した。その一例を図 3 に示す。Discovery 群および Validation 群ともに、代謝物 A ではループス腎炎で、代謝物 B では糖尿病性腎症で、各



Discovery, validation ともに共通した傾向がみられる。

図 3. ネフローゼ症候群上位 7 疾患を鑑別するバイオマーカー候補代謝物の診断性能

物質の濃度が高いことが判った。さらに、各代謝物濃度をパラメーターとしてロジスティックモデルを作成して複数の代謝物を組み合わせることで鑑別能は上昇し、4代謝物の組み合わせで AUC 値が 0.95 を示す優れたバイオマーカー候補代謝物セットも得られた。

これらの結果から血液および尿に含まれる代謝物の濃度は、ネフローゼ症候群上位 7 疾患の鑑別に大変有用なことが明らかとなった。続いて、より診断精度を高めるために尿中代謝物濃度の正規化について検討した。すなわち、メタボローム解析では測定された各代謝物の濃度は M (モル濃度) で得られるが、例えば、尿の濃い薄いによって各代謝物濃度は変動する。他の尿中物質を測定する場合でもクレアチニンで各値を正規化することが行われており、本研究でも、クレアチニン濃度や浸透圧などの影響を評価した。その結果、クレアチニン量と浸透圧は正相関しており (図 4)、男女別に分けても差異は無かった (図 5)。また、年齢別で分けてもクレアチニン量と浸透圧との正相関関係に差異は認められなかった (図 6)。続いて、各代謝

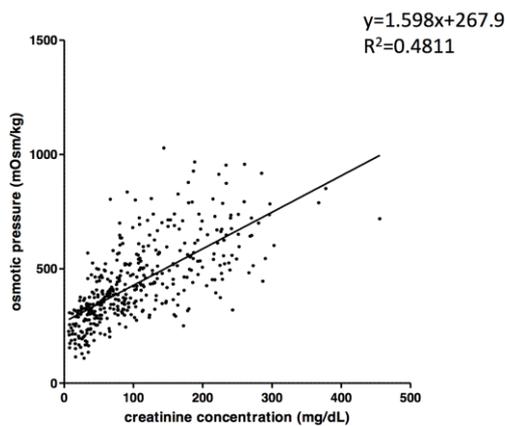


図 4. クレアチニン量と浸透圧の関係

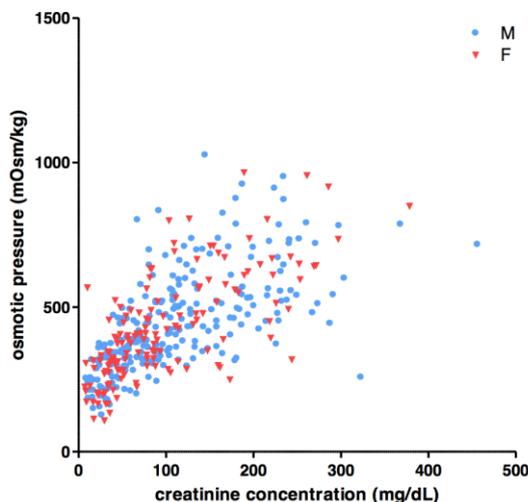


図 5. クレアチニン量と浸透圧の関係 (性別比較)

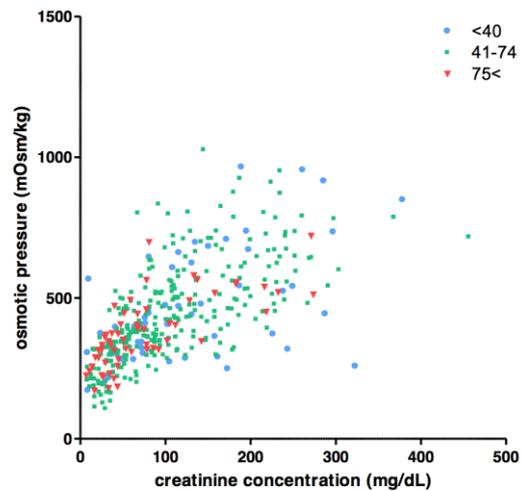


図 6. クレアチニン量と浸透圧の関係 (年齢別比較)

物濃度をクレアチニン量で正規化して、病態鑑別性能が変化するか確認したところ、Discovery 群および Validation 群ともにクレアチニン量による正規化の影響は認められなかった。(図 7)

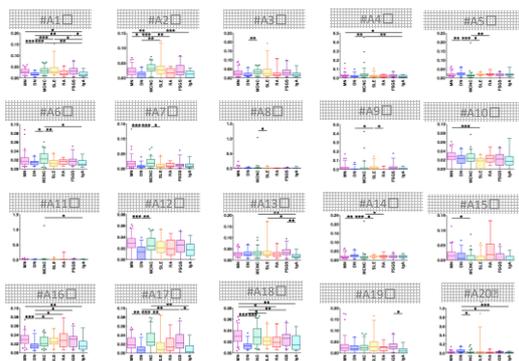


図 7. クレアチニン量と浸透圧で補正した各代謝物濃度の一例

次に、腎機能を評価できる代謝物セットを同定するために、イヌリンクリアランス (実測 GFR) と相関する代謝物をスクリーニングした。その結果、10 種類以上の代謝物が腎機能と有意に相関する代謝物として同定された (図 8)。これら腎機能と相関する代謝物の発見は、時間のかかるイヌリンクリアランス試験を実施することなく、一度の血液検査のみで腎機能を評価できることを示している。

以上、本研究の結果、血液または尿に含まれる低分子の代謝物は、腎疾患の鑑別や腎機能評価の診断ツール (バイオマーカー) として利用できる可能性が示めされた。今後、実用化を目指したより詳細な検討の実施が望まれる。

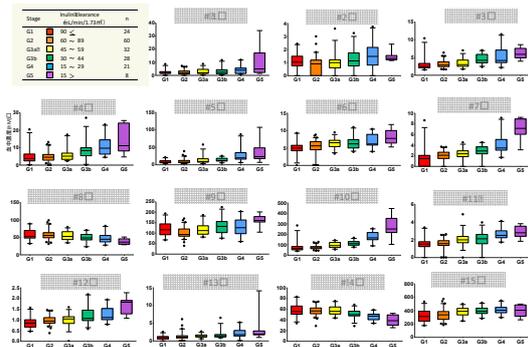


図8. 腎機能（実測イヌリンクリアランス）と有意に相関する代謝物群の一例

## 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）

- 1) Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S, Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy., Clin Exp Nephrol. 2015 Aug;19(4):653-60. Epub 2014 Nov 21. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- 1) メタボローム解析技術を用いたCKDの尿中バイオマーカー探索, 平山明由, 秋山真一, 尾崎武徳, 松尾清二, 曾我朋義, 丸山彰一, 第58回日本腎臓学会学術総会, 名古屋, 名古屋国際会議場, 2015/6/5-7
- 2) メタボローム解析技術を用いたCKDのバイオマーカー探索, 平山明由, 尾崎武徳, 秋山真一, 池田五月, 渡部瑠美, 丸山彰一, 松尾清二, 曾我朋義, 第57回日本腎臓学会学術総会, 横浜, パシフィコ横浜, 7/4-7/6 (シンポジウム)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎武徳 (OZAKI, Takenori)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号： 1 0 4 5 2 1 9 5

### (2) 研究分担者

松尾清一 (MATSUO, Seiichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 7 0 1 9 0 4 1 0

丸山彰一 (MARUYAMA, Shoichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 1 0 3 6 2 2 5 3

秋山真一 (AKIYAMA, Shinichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号： 2 0 5 0 0 0 1 0

平山明由 (HIRAYAMA, Akiyoshi)

慶應義塾大学・大学院政策メディア研究科・

特任助教

研究者番号： 0 0 5 7 2 4 0 5

### (3) 連携研究者

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： 6 0 3 3 8 2 1 7