

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461963

研究課題名(和文) 血液・尿メタボローム解析による腎移植後急性拒絶反応診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for acute rejection after kidney transplantation by blood / urinary metabolome analysis

研究代表者

岩本 整 (Iwamoto, Hitoshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338831

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)：血液・尿メタボローム解析による腎移植後急性拒絶反応診断法の開発の研究を行った。腎移植ドナー(健常人、n=9)、腎移植後腎機能正常群(n=19)、腎移植後腎機能障害群(n=32)の血液60検体、尿60検体のメタボローム解析を行った。その結果、コントロール群に比べ有意差(p<0.001)のある物質が血液でADMA, Dithanolamine, Glycerophosphorycholine, Isocitrate, Phe, SDMA, Serotonin, Valの計8種類あり、尿で3-Indoxy sulfate, ADMA, N-Acetylhistidineの計3種類認められた。

研究成果の概要(英文)：We studied the development of diagnostic method for acute rejection after kidney transplantation by blood / urinary metabolome analysis. The group was divided into 3 groups such as donor group, normal renal function after renal transplantation, kidney function disorder after renal transplantation group. As a result, there were 8 kinds of substances such as ADMA, Dithanolamine, Glycerophosphorycholine, Isocitrate, Phe, SDMA, Serotonin, Val having significant difference compared with the control group, and 3 kinds such as 3-Indoxy sulfate, ADMA, N-Acetylhistidine were recognized with urine.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 急性拒絶反応 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

臓器移植に際してドナーとレシピエントとの間で HLA(human histocompatibility leukocyte antigen)対立遺伝子の不一致が存在すると、レシピエントの T 細胞の一部がドナーの組織に発現するアロ(同種異型)HLA 分子などに免疫応答を開始する。

移植片に対する拒絶反応は、このような T 細胞による移植細胞に発現する非自己抗原の認識と免疫応答を、マクロファージや NK 細胞による細胞破壊、ならびにアロ抗原に特異的な抗体を介した移植細胞の排除などがおもな原因となって発生する。この機序のいずれかの pathway をブロックするのが種々の免疫抑制剤である。移植患者における免疫のバランスがくずれた場合拒絶反応が発生する。

ARの診断を目的として血液や尿など低侵襲に収集できる体液から診断マーカーを発見する研究は散見されているが未だ診断率が低く実用的なマーカーが無いのが現状である。血中の蛋白マーカーとしては、IL-2、TNF- α などが診断に有用との報告もあるが広く汎用されるには至っていない。尿中のマーカーも同様である。腎移植後急性拒絶反応は10から20%の頻度で発生し診断を誤ると移植腎予後にも影響するため治療成績を改善するためには、低侵襲で精度の高い診断が決定的に重要である。従来とは異なる新規開発技術を用い、より簡便かつ安価な測定方法の確立が急務である。本研究では、革新的方法による急性拒絶反応における低侵襲なバイオマーカーの発見を目指す。また慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我らは、開発したキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計

(CE-TOFMS)を用いて、アセトアミノフェンによって引き起こされる急性肝炎の血中バイオマーカーを発見した。この物質がオフタルミン酸であることを特定し、グルタチオンの減少によってグルタミルシステインシンセターゼという酵素が活性化し、オフタルミン酸が生成されるメカニズムも解明している。このバイオマ-

ーカーが肝障害や肝炎ウイルスキャリアーでも確認され、血液中のオフタルミン酸濃度を測定することにより、薬物による急性肝炎やウイルス性肝炎の早期診断が可能になっている。

2. 研究の目的

移植腎機能障害に遭遇した際、われわれは腎後性腎機能障害等の器質的疾患、急性拒絶反応(acute rejection: AR)、Chronic allograft nephropathy (CAN)、薬剤性腎障害、急性尿細管壊死(acute tubular necrosis: ATN)等の疾患を発症時期を考慮しながら、まず臨床症状や血液生化学的検査、画像検査等の検査から診断をする。しかし AR と薬剤性腎障害の鑑別診断はこれらの臨床検査では診断が難しいことが報告されている。このような場合、腎生検は現時点では腎機能障害の原因を診断する上でゴールドスタンダードと言える。一方、腎生検は低率ながら重篤な合併症が報告されている。低侵襲で精度の高い AR の診断法は腎移植患者にとって非常に有益である。

一方メタボロミクスは、代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定して、環境や疾患などの要因により変化する代謝物から細胞の機能解析や、各疾患の診断応用などを研究する最も新しいオミックスである。研究分担者の砂村はこのメタボロミクスを消化器癌診断に応用し、膵癌・胆道癌をはじめとする難治癌の早期診断法の研究の第一人者である。今回この研究を腎移植後の代表的な合併症である AR の診断に応用することを着想した。申請者らは、急性肝炎のバイオマーカーの発見や、大腸癌や胃癌組織における網羅的な代謝プロファイルの測定を行ってきた実績がある。この知識を応用し AR の診断に有用なバイオマーカーを後述する方法にて発見し臨床応用するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

血清クレアチニン上昇がみられ AR が疑われる患者から血液・尿を採取する。同時に移植腎生検を行う。血液や尿メタボローム解析を行うた

めの採取条件を決定したうえで、移植腎機能障害患者から血液と尿を採取する。血液と尿との代謝プロファイルと比較検討すると共に、急性拒絶患者と健常者における血液や尿の代謝プロファイルの相違点を解析する。患者から得られた臨床情報（移植腎生検の病理診断など）と代謝プロファイルとの関連性を解析し、拒絶反応の重症度による特徴的な代謝物質マーカーを同定する。さらに移植腎生検例から得られた組織標本を用い、組織における代謝プロファイルを血液や尿と比較する。

(1) メタボローム解析による検討

血液および尿のメタボローム解析から両者の代謝産物の違いを比較検討する。さらに健常者から得られたメタボローム解析データとの違いを分析し、拒絶に特徴的な代謝産物を同定する。

(2) 組織を用いたメタボローム解析

血液・尿から得られた特徴的な代謝産物が組織においても同様に増加ないしは減少しているかを確認する。これら代謝産物の産生過程に注目し、酵素などの代謝産物を増加もしくは減少させる役割を担う蛋白を同定する。

(3) 診断マーカーの有用性の評価

血液・尿メタボローム解析から得られた診断用マーカーの有用性を確認するために、検体情報をブラインドとしてメタボローム解析を行い、提案された診断システムの正診率を評価する。正診率が有意差を持って高率であれば、このメタボローム解析の代謝産物に関して特許を申請する。同様の検討を研究グループに属していない医療機関にサンプルの提供を求め、提案された診断用マーカーの有用性を再評価する。

(4) オミックスの統合

DNA（ジェノミックス）、mRNA（トランスクリプトミックス）、タンパク質（プロテオミックス）、代謝物質（メタボロミックス）の情報を統合し、急性拒絶反応における特徴的な代謝過程を解明し、中心的な役割を担う物質を解明する。これらの解析にはコンピューターを用いた情報科学技術が必要である。

組織においてのターゲットとする物質の発現を免疫染色により評価し、さらに各重症度における発現の差異を比較検討する。

4. 研究成果

血液・尿メタボローム解析による腎移植後急性拒絶反応診断法の開発の研究を行った。腎移植ドナー（健常人、n=9）、腎移植後腎機能正常群（n=19）、腎移植後腎機能障害群（n=32）の血液 60 検体、尿 60 検体のメタボローム解析を行った。その結果、コントロール群に比べ有意差（ $p < 0.001$ ）のある物質が血液で ADMA, Dithanolamine, Glycerophosphorycholine, Isocitrate, Phe, SDMA, Serotonin, Val の計 8 種類あり、尿で 3-Indoxy sulfate, ADMA, N-Acetylhistidine の計 3 種類認められた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 整 (IWAMOTO, Hi thoshi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：00338831

(2) 研究分担者

砂村 眞琴 (SUNAMURA, Makoto)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：10201584

杉本 昌弘 (SUGIMOTO, Masahiro)
慶応義塾大学・医学研究科・特任准教授
研究者番号：30458963

中村 有紀 (NAKAMURA, Yuki)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：50349487

島津 元秀 (SHIMAZU, Motohide)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：70124948

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()