

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21364

研究課題名(和文)メタボローム解析を駆使した新規腎疾患診断マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of a novel diagnosis marker for kidney diseases by metabolome analysis

研究代表者

平山 明由(HIRAYAMA, Akiyoshi)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任講師

研究者番号：00572405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キャピラリー電気泳動-質量分析法(CE-MS)を用いて、ネフローゼ疾患患者の尿、および血漿中のイオン性代謝物の一斉分析を行い、病型特異的なバイオマーカーの探索を行った。結果、2～5種類の代謝物を組み合わせることにより7種のネフローゼ疾患から特定の疾患を判別するモデルを作成することが可能であった。また、未知ピークに関してはLC-MSを用いた分取操作を行い、新規バイオマーカー候補の同定を行うことが可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, a comprehensive analysis of urine and plasma metabolites from nephrotic disease patients was conducted by capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) in order to discover biomarkers specific to the type of disease. As a result, it was possible to create a model to distinguish from seven types of nephrotic diseases by combining two to five types of metabolites. With respect to unknown peaks, it was possible to perform a fractionation operation using LC-MS to identify new biomarker candidates.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：腎疾患 マーカー CE-MS 尿 血漿

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎疾患の診断について

現在、腎炎やネフローゼ症候群などの腎疾患の確定診断には腎生検が必要であるが、腎生検は出血のリスクを伴う侵襲のある検査である。そのため、全身状態の悪い患者や高齢者などにおいては施行できない場合も多く、診断、病態の把握や適切な治療法の選択が困難となる。また、その侵襲性の高さから、糖尿病性腎症や腎硬化症においては通常腎生検は施行されずに臨床的な推測によって診断されることが多い。腎生検を行わずに、血液や尿などの体液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考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メタボローム解析技術を用いてヒト臨床検体（血液及び尿）を解析することにより、種々の腎疾患（腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症など）の疾患診断マーカーおよび新規創薬候補の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いたサンプル

①尿検体

研究協力者の所属する名古屋大学医学部附属病院にて腎生検を行い、診断の確定している腎疾患患者の内、7種のネフローゼ症候群（IgA腎症、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、巣状糸球体硬化症、アミロイド腎症）の274検体を用いた。

また、バリデーション用検体として独立した120検体を用いた。

②血漿検体

①で測定した検体の内、血漿も保存されていた186検体を用いた。

(2) サンプル前処理

①尿の前処理

まず最初に、酵素法にて尿中クレアチニンの定量を行った後、各検体の最終のクレアチニン量が約10 mg/dLとなるように希釈を行った。ただし、1検体毎に正確に調整するのは困難であったため、各クレアチニン群毎に希釈率を調整した（クレアチニン値 50~100 mg/dL→10倍希釈、25~50 mg/dL→5倍希釈、10~25 mg/dL→2倍希釈、10 mg/dL以下→薄めない）。

希釈した各検体はその後、分画分子量5,000 Daの限外ろ過フィルターに通してから、測定を行うまで-80℃のフリーザーで保管を行った。

②血漿の前処理

50 µLの血漿に450 µLのメタノールを加えて代謝酵素を失活させた後、クロロホルム、

MilliQ水を加えて分液操作を行った。水相を分画分子量5,000の限外ろ過フィルターに通し、ろ液を減圧乾固し、測定を行うまで-80℃のフリーザーで保管を行った。

③CE-TOFMS（キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計）による代謝物の一斉測定

血漿検体は、測定前に50 µLのMilliQ水に再溶解し、陽イオン分析および陰イオン分析の2種類のCE-TOFMS条件にて測定を行った。尿検体は融解後、そのまま測定を行った。

各代謝物の量は、尿の場合は単位クレアチニンあたりの相対値、血漿の場合はモル濃度(µM)に換算して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 尿のメタボローム解析

今回、CE-TOFMSを用いたメタボローム解析によって、腎疾患患者尿中より220種類の代謝物ピークを検出することができた。その内、標準化合物を用いたピーク同定ができたのは127物質であり、残りは未同定であった。

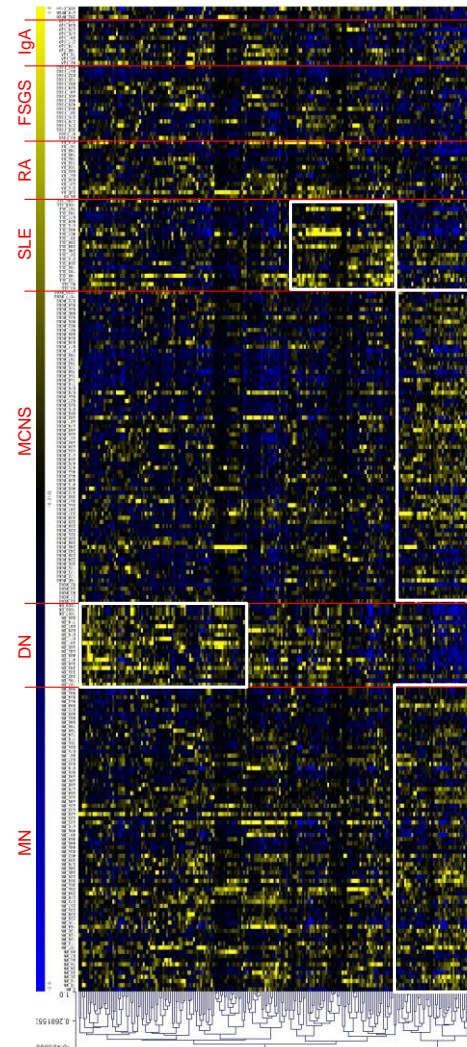


図1 ネフローゼ疾患患者尿中より検出された代謝物を用いたヒートマップ

今回検出された全ピークを用いてヒートマップ解析を行った結果を図1に示す。白線で囲われた箇所においては疾患特異的に代謝物が変動している可能性が示唆された。

次に、これらのピークに対して統計解析 (Kruskal-Wallis test) を行った結果、74成分で有意差が見られた ( $p < 0.001$ )。

## (2) ロジスティック回帰モデルを用いた疾患判別モデルの作製

一部の疾患に対しては、単独の代謝物で精度よく他の疾患と判別できる可能性のある代謝物も見つかったが、多くの疾患では困難であった。そこで、複数の代謝物を組み合わせたモデル (ロジスティック回帰モデル) を作製することにより、判別精度を上げること検討した。

図2に糖尿病性腎症を判別するモデルの例を挙げる。単独では、アルギニンが最も高いAUC値 (0.8519) を示したが、5種類の代謝物を組み合わせることによって、AUC値が0.9514に上昇した。

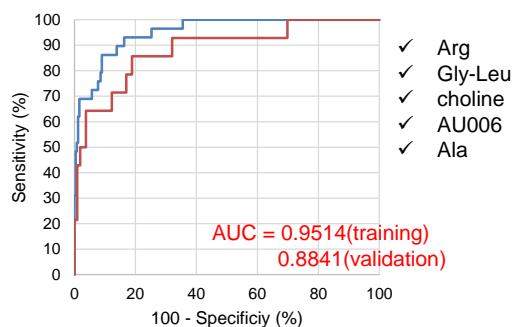


図2 糖尿病性腎症を判別するためのロジスティック回帰モデル

さらに、作製したモデルが特定のデータセットに依存していないことを確認するために、独立した別のデータセット (120 検体) に対しても適用した。バリデーションの結果、AUC値は0.8841となり、本モデルの汎用性が証明された。

他の6種の疾患に対しても同様のモデルを作成した。2~5種類の代謝物の組み合わせによって、すべての疾患を他の6疾患から精度よく判別することが可能であった。

## (3) 血漿のメタボローム解析

(1) で測定した検体内、血漿検体も保存してあった186検体についてもCE-MSによるメタボローム解析を実施した。

CE-TOFMSを用いたメタボローム解析によって、腎疾患患者血漿中より89種類の代謝物が半数以上の検体において検出可能であった。

これらの代謝物を用いて主成分分析を行った結果を図3に示す。

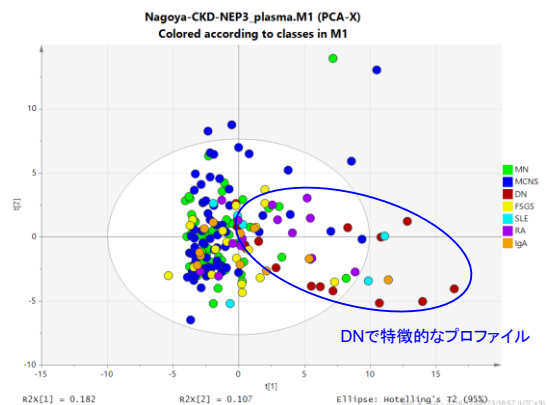


図3 ネフローゼ疾患患者血漿中より検出された代謝物を用いた主成分分析結果

(MN, 膜性腎症; MCNS, 微小変化型ネフローゼ症候群; DN, 糖尿病性腎症; FSGS, 巣状糸球体硬化症; SLE, ループス腎炎; RA, アミロイド腎症; IgA, IgA腎症)

糖尿病性腎症は他の疾患と比較して特徴的なプロファイルを示したが、その他の疾患はほとんど差が無かった。

## (4) 分取液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた尿中バイオマーカー候補の同定

(1) の検討で、特定の疾患を判別する良いマーカー候補がいくつか見つかったが、同定できないものもあったため、これらを同定する手法の開発を行った。

分取液体クロマトグラフィーに質量分析計を接続したシステムを用いて、尿中の当該ピークのみを繰り返し分取して、構造決定が可能かどうか検討した。

異なる分離メカニズムのLCカラムを用いた3つのLC条件を適用することにより、尿中から特定の成分を精製し、これを核磁気共鳴で構造推定した。

構造推定した化合物に関しては、標準化合物の合成を行い、当該未知ピークと泳動時間、精密質量、タンデムマススペクトルが一致することを確認した。

## 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 2 件)

① Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Tomita T, Tawada M, Tanaka A, Hirayama A, Sagara A, Wada T, Maruyama S, Soga T, Matsuo S, Imai E, Takei Y. Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in sub-total-

nephrectomized mice. Laboratory Investigation; 97: 432-446; (2017).

②平山明由、湯澤由紀夫 メタボロミクスを用いた新たな尿検査の可能性 日本臨床検査自動化学会誌 (JJCLA) 42: 163-166; (2017).

[学会発表] (計 4 件)

①平山明由、秋山真一、尾崎武徳、松尾清一、曾我朋義、丸山彰一 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 第58回日本腎臓学会学術集会 2015年6月 愛知県名古屋市

②平山明由 CE-MS メタボロミクスとその臨床応用 第42回BMSコンファレンス 2015年7月 岐阜県岐阜市

③平山明由 CE-MS メタボロミクスとその臨床応用 第12回東北大学学際科学フロンティア研究所 FRIS セミナー 2016年8月 宮城県仙台市

④平山明由、湯澤由紀夫 メタボロミクスを用いた新たな尿検査の可能性 日本臨床検査自動化学会 第48回大会 2016年9月 神奈川県横浜市

[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

平山 明由 (HIRAYAMA, Akiyoshi)  
慶應義塾大学 政策・メディア研究科  
特任講師  
研究者番号：00572405

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者  
丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)  
秋山 真一 (AKIYAMA, Shinichi)