

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16943

研究課題名（和文）早期診断のためのシスチノーシス（シスチン蓄積症）バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of biomarkers for early diagnosis in cystinosis

研究代表者

清水 有紀子（Shimizu, Yukiko）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・動物実験施設 専任研究員

研究者番号：00469983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：シスチノーシスモデルラット由来の胚線維芽細胞を用いてCtns遺伝子の有無により特異的に変化するタンパク質および代謝物をプロテオームおよびメタボローム解析を行い探索した。またプロテオーム解析より得られたシスチン代謝関連タンパク質が金属タンパク質であったことから8週齢シスチノーシスモデルラットの血清中の金属を測定し、バイオマーカーとしての可能性を探った。測定した19種類の金属のうちシスチノーシスモデルラットで有意に増加した金属が8種類、減少した金属が1種類見つかった。本研究により、シスチンが蓄積することにより金属の代謝異常も引き起こされる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シスチノーシスはCTNS遺伝子変異によりライソゾームにシスチンが蓄積する常染色体劣性遺伝疾患である。早期診断早期治療により劇的に予後が改善するものの、血液中のシスチン濃度ではシスチノーシスを診断できないため、濾紙血で行う新生児マススクリーニングへの応用ができず、現在の確定診断法では早期診断は困難である。本研究において、シスチン蓄積に伴った金属代謝の関連が示唆されたことにより、未だに不明なことが多いシスチノーシス発症機序の解明と早期診断のためのバイオマーカー発見の糸口となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, proteomic and metabolomic analyzes were performed using embryonic fibroblasts derived from cystinosis model rats to find out proteins and metabolites that are specifically altered by the presence or absence of the Ctns gene. In addition, since the cystine metabolism-related proteins obtained from the proteome analysis were metalloproteins, we measured the metals in the rat serum of 8-week-old and explored their potential as biomarkers. Among 19 metals measured, 6 metals significantly increased and 1 metal decreased in cystinosis model rats. This research indicated that cystine accumulation may also cause abnormal metal metabolism.

研究分野：実験動物学

キーワード：シスチノーシス バイオマーカー 微量金属

1. 研究開始当初の背景

シスチノーシスはライソゾーム膜に存在するシスチントランスポーターであるシスチノシンをコードする *CTNS* 遺伝子の変異によって全身性にシスチンが蓄積する難治性の常染色体劣性の遺伝疾患である。シスチンの蓄積により全身に症状が現れるが、近位尿管障害に起因する若年期のファンコニー症候群が特徴的な症状の一つである。2つの後方視的臨床研究により、早期のシステアミン内服が腎機能不全を含めた生命予後を劇的に改善することが示されている¹⁾²⁾。しかしながら、失った腎機能を元に戻すことはできず、新たな根治療法の開発も必要である。

さらに、シスチノーシスは、理想的には生後6ヶ月以内に、診断し治療を開始することが求められているが、現在の白血球中のシスチン濃度による確定診断法では濾紙血で行う新生児マススクリーニングへの応用ができず、早期診断が困難である。近年、質量分析装置の向上などにより対象疾患も増えているが、血液中のシスチン濃度ではシスチノーシスを診断できないため、シスチン以外の生体物質での診断、すなわち疾患特異的なバイオマーカーが有用となる。

2. 研究の目的

シスチノーシス研究はモデル動物の開発により、ライソゾーム内のシスチン蓄積によるアポトーシスの亢進や酸化ストレスの増加等さまざまな報告がされているものの³⁾、まだ未解明なメカニズムが多い。シスチノーシスのバイオマーカーの発見は、早期診断早期治療開始に役立つだけでなく、合併症の予防も可能にする他、病気の進行の指標にもなりうる可能性がある⁴⁾。

本研究は、シスチノーシスの原因遺伝子である *Ctms* 遺伝子を欠損したラットを用いて、網羅的な解析を行うことにより疾患特異的に変動するタンパク質や代謝物を検出し、シスチノーシスの早期診断および疾患の進行を反映するバイオマーカーを同定すると共に、疾患発症の分子メカニズム解明の糸口となる分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

1) シスチノーシスモデルラット用いたプロテオーム解析・メタボローム解析

申請者等が樹立した *Ctms* 遺伝子を欠損したシスチノーシスモデルラット⁵⁾およびコントロール (F344) ラットを用いて胚線維芽細胞を作成し、プロテオーム解析に用いた。それぞれの細胞からタンパク質を抽出し、還元アルキル化した後、トリプシン酵素消化をして得られたペプチドサンプルを用いて、質量分析装置 (QSTAR Elite:SCIEX) によりプロテオーム解析を行なった。

メタボローム解析については、それぞれの細胞からメタノールを用いてメタボライトを抽出した後、限外濾過フィルターにて除タンパクしたものを解析に用いた。抽出したメタボライトは CE-TOFMS (アジレントテクノロジー) にて測定し、検出されたメタボライトに対して相対値を算出した。メタボローム解析はヒューマンメタボローム (HMT) 社に外部受託した。

2) 1) で得られたタンパク質・代謝物および微量元素の定量と発現解析

シスチノーシスモデルラット由来胚線維芽細胞から RNA を抽出し、qPCR を行なった他、ウエスタンブロットを用いることにより発現解析を行なった。相対値比較により特異的な変化がみられた代謝物に関しては、ラットの血液を用いて LC/MS での定量を試みた。また微量元素については ICP/MS を用いた分析 (レナテック社) を行なった。

4. 研究成果

本研究では、シスチノーシスモデルラット由来の線維芽細胞および血液を用いた解析により、疾患特異的に変化する物質を同定し、その物質がバイオマーカーや疾患発症メカニズム解明に関わる分子となり得るかを探った。

プロテオーム解析では、シスチノーシスモデルラット由来の細胞株においてコントロール株と比較して有意に増加したタンパク質は 12 個あり、逆に減少したタンパク質は 46 個であった。そのうち、もっとも増加していたタンパク質は金属プロテイン酵素に属するタンパク質であったことから、8 週齢ラット血清中の金属を測定した。その結果、コントロール系統と比較し、19 種類の血清中微量元素は 8 種類が有意に増加、1 種類は有意に減少していた。病態の進行と微量元素濃度変動に相関があるかを確認するため、56 週齢のシスチノーシスモデルラット血清を用いて検証した結果、さらに濃度が増加あるいは特に減少した金属はそれぞれ 2 および 4 種類であった(図 1)。変化があった金属の一部を細胞内に輸送する膜タンパクの発現解析を行なったところ、顕著な変化は見られなかった為、引き続き解析を進める。

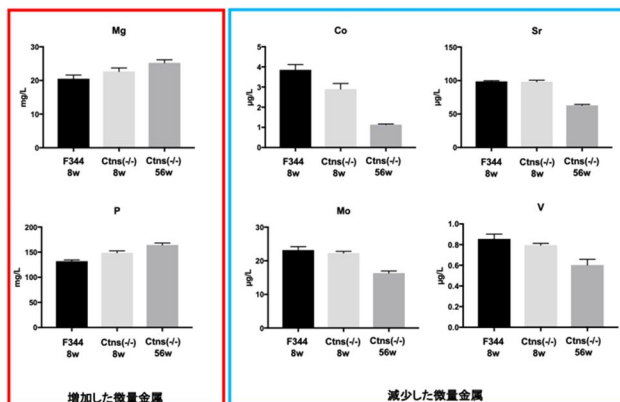


図1:シスチノーシスモデルラット血清において変化が見られた微量元素

シスチノーシスモデルラット由来REFを用いて行ったメタボローム解析では代謝化合物 175 個が検出され、そのうち有意水準 $P < 0.001$ を示した代謝化合物は 4 個であった。また、本解析においてはシスチノーシスモデルラット由来REFにシスチノーシスの治療薬であるシステアミンを添加した細胞も使用し、解析に用いた。その結果、検出された代謝物に対する主成分分析において細胞試料の差異が明確に分類され、さらにシステアミンを添加した細胞はシスチンの蓄積が除去されたにも関わらず、代謝物がコントロールとも明確に分類された(図 2)。

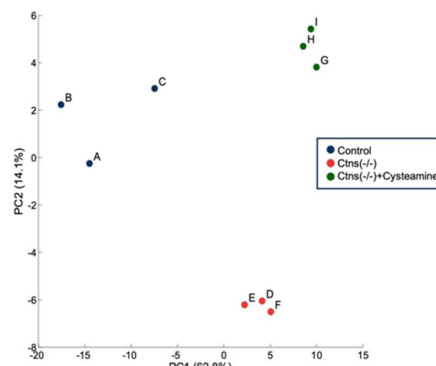


図2:シスチノーシスモデルラット由来線維芽細胞を用いたメタボロームの主成分分析

本研究により、シスチンが蓄積することにより、微量元素の代謝異常が引き起こされている可能性が示された。またメタボローム解析の主成分分析より差異が明確に分類され、治療薬を服用しても腎機能不全を含む合併症を遅延させるだけで防ぐことができない原因を解明する一助となる可能性が示されたため、引き続きそれらのメカニズムを明らかにしていく予定である。

引用文献

- 1). William A et al, *Ann Inter Med.*2007, Aug 21;147(4):242-250.
- 2). Albane BS et al, *Kindeg Int* 2012, Jan;81(2):179-189.
- 3). Langman CB et al, *Kidney Int.* 2016, Jun;89(6):1192-1203.
- 4). Emma F et al, *Cells.* 2022, Jun4;11(11):1839.
- 5). Shimizu Y, *Mamm Genome,* 2019, Feb;30(1-2):23-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hsiao SW, Ishii C, Furusho A, Hsieh CL, Akita T, Mita M, Okamura T, Konno R, Ide T, Lee CK, Hamase K	4. 巻 1869
2. 論文標題 Determination of phenylalanine enantiomers in the plasma and urine of mammals and D-amino acid oxidase deficient rodents using two-dimensional high-performance liquid chromatography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Proteins Proteom	6. 最初と最後の頁 140540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2020.140540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yukiko, Ishii Chiharu, Yanobu-Takanashi Rieko, Nakano Kenta, Imai Akio, Mita Masashi, Hamase Kenji, Okamura Tadashi	4. 巻 1868
2. 論文標題 d-Amino acid oxidase deficiency is caused by a large deletion in the Dao gene in LEA rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140463 - 140463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2020.140463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片桐大輔、清水有紀子、赤平百絵、山本祐香、岡村匡史
2. 発表標題 小児ファンコニ症候群患者でのシスチノーシス検査の意義について
3. 学会等名 第56回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiharu ISHII, Yukiko SHIMIZU, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Tadashi OKAMURA, Kenji HAMASE
2. 発表標題 Development of a two-dimensional LC-MS/MS system for the selective determination of intrinsic chiral amino acids and application to mammalian plasma
3. 学会等名 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水有紀子、石井千晴、高梨-矢延理絵子、中野堅太、今池瑛生、浜瀬健司、岡村匡史
2. 発表標題 新規D-アミノ酸オキシダーゼ(Dao)遺伝子欠損ラットの樹立
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐大輔、清水有紀子、赤平百絵、岡村匡史
2. 発表標題 透析患者におけるシスチノーシス検査の重要性
3. 学会等名 第65回日本透析医学会 学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡村匡史、清水有紀子、片桐大輔、荒川玲子、山本裕香、赤平百絵
2. 発表標題 LC/MSを用いた腎透析中シスチノーシス患者に対するシステアミン治療の有効性評価
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水有紀子、中野堅太、岡村匡史
2. 発表標題 シスチノーシスモデルマウスにおける系統差を用いたシスチン代謝修飾遺伝子の探索
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水有紀子、中野堅太、後藤元人、岡村匡史
2. 発表標題 マウス系統差を利用した新規シスチン代謝修飾遺伝子の探索
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------