

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5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592310

研究課題名（和文） 急性腎障害の早期予後予測：網羅的プロテオーム解析による尿中バイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Identification of urinary biomarkers to predict onset of acute kidney injury with proteomic analysis

研究代表者

笠岡 俊志 (KASAOKA SHUNJI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90243667

研究成果の概要（和文）：急性腎障害（AKI）の早期診断に対する尿中バイオマーカーの有用性について検討した。尿中L-FABP（liver-type fatty acid binding protein）よりも尿中NGAL（neutrophil gelatinase-associated lipocalin）の方が有用性が高いことが示唆された。さらに尿検体を用いた網羅的プロテオーム解析にて368種類の蛋白質が検出され、新たなバイオマーカーの確立の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the usefulness of urinary biomarker for early diagnosis of acute kidney injury (AKI). Our study suggested that urinary NGAL might be more useful for early diagnosis of AKI than urinary L-FABP. In addition, 368 kinds of proteins by proteomic analysis of urine have been detected, and it is to be expected to establish a new biomarker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：急性腎障害、尿中バイオマーカー、プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害（acute kidney injury: AKI）は重症救急患者の合併症としてしばしば認められ、予後を大きく左右する。さらに腎不全に対する血液浄化療法は、医療経済的にも、重症患者管理の面でも大きな負担となる。急

性腎障害の原因は多岐にわたるが、腎障害の原因となるストレスが加わった患者において、早期に予後予測を行い、積極的な腎保護療法が必要か否かを判断することは、臨床上大変有益である。しかしながら、救急患者に発生する急性腎障害を早期に予測するバイ

オマーカーは未だ確立されていない。

網羅的プロテオーム解析は、少量のサンプルを用いて細胞を構成する全ての蛋白質を網羅的に解析可能な手法であり、様々な疾患の病態解明に応用されている。我々も網羅的プロテオーム解析システムを構築し、脳脊髄液を検体としたプロテオーム解析により重症脳障害の病態解明を行っている。

我々は横紋筋融解症において血中ミオグロビンの迅速測定が腎不全の High Risk 患者の予測に有用であることを報告した (Crit Care Med 2005;33:A40)。しかしながら、腎障害の原因となるストレス発生 (ショックや高ミオグロビン血症など) からできるだけ早期に予後予測を行うためには、尿中バイオマーカーの有用性が高いと考え、腎臓の近位尿細管障害を反映するとされる尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の測定を試みている。近年、急性腎障害の早期診断に有用と期待されるいくつかの尿中バイオマーカーが報告されているが、未だ評価は定まっていない。

2. 研究の目的

本研究では、急性腎障害の早期診断に対する尿中 L-FABP および尿中 NGAL の有用性を検討するとともに、網羅的プロテオーム解析を用いて、1 回の測定で急性腎障害の早期予後予測が可能な尿中バイオマーカーの確立を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究 A

山口大学医学部附属病院高度救命救急センターに緊急入院した患者 (連続 40 例) を対象に、入院時の随時尿で尿中 L-FABP および尿中 NGAL の測定を行い AKI 発症の有無と尿中バイオマーカーの関連を検討した。

急性腎障害の診断には AKIN (Acute Kidney Injury Network) の分類を用いた。

【AKIN 診断基準】

以下の何れかを満たす腎機能の突然の低下 (48 時間以内) を認める場合

- ①血清クレアチニン値 0.3mg/dl 以上の上昇
- ②血清クレアチニン値 50% 以上の上昇 (基礎値から 1.5 倍以上の上昇)
- ③乏尿 (時間 0.5ml/kg 未満, 6 時間以上)

(2) 研究 B

山口大学医学部附属病院高度救命救急センターに緊急入院した患者のうち、以下の 4 つの選択基準

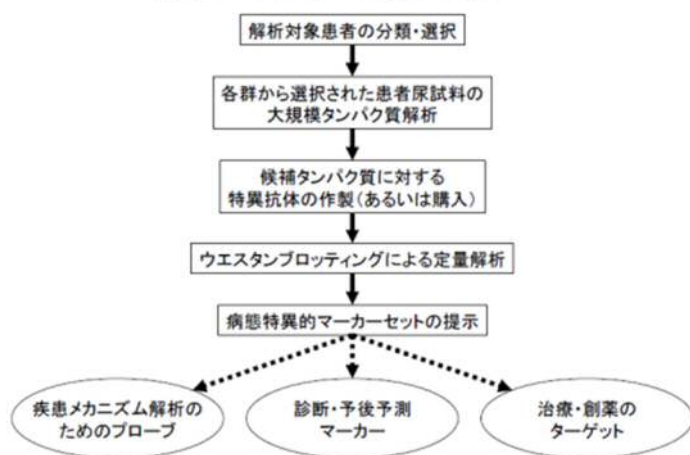
- ①心肺停止蘇生後
- ②ショック: 血圧低下 (収縮期血圧 90mmHg 以下) とともに意識障害、乏尿などの循環不全の徴候を認める場合
- ③重症敗血症: 循環不全および臓器機能不全を伴う敗血症
- ④高ミオグロビン血症: 血中ミオグロビン 1000 ng/ml 以上

を満たす患者を登録して、入院時に尿中 L-FABP および尿中 NGAL の測定を行い AKI 発症の有無との関連を検討するとともに、尿検体を用いた網羅的プロテオーム解析を行い新たな尿中バイオマーカーについて検討した。

【尿検体を用いた網羅的プロテオーム解析】

急性腎障害を発症した患者群 (K 群) と発症しなかった患者群 (C 群) に分けて、各群の尿検体をプールし、定量的大規模解析により腎障害患者群特異的な蛋白質の探索を行う。大規模蛋白質同定の手順に則り、各試料のトリプシン消化物を調製する。最大 4 種類までの試料について、各々異なった質量数を持つ iTRAQ 試薬 (4 種類の安定同位体標識試薬、アプライドバイオシステムズ社製) によりペプチドを標識する。4 種類の試料を混合し、全自動大規模蛋白質解析システムにより蛋白質同定を行う。同定されたペプチド配列のマススペクトルに見られる 4 種類の同位体由来シグナルの相対比に基づき定量情報を取得する。本法は試料組成が複雑になり、同定蛋白質数が減少するが、①1.5 倍程度の量的変化を検出できる、②大規模蛋白質同定と定量を同時に行うことで尿蛋白質全体の動態を把握できる、③最大 4 種類の試料を 1 回の分析操作で解析するため全体としての解析時間を 1/4 に短縮できる、などの利点が上げられる。同定蛋白質の相対定量値とアノテーション情報に基づき分類し、候補蛋白質群の対象患者試料に対する抗体を作製、もしくは購入して、特異性をウェスタンブロッティングにより確認する。

病態プロテオミクスの解析ストラテジー



その他の評価項目は以下のとおりである。

①治療法：対象患者の集中治療管理法（血液浄化療法を含む）。その内容は主治医の判断に委ね、介入しない。急性腎障害に対する治療内容を調査する。

②腎機能と予後：救命センター退室時の一般的腎機能、救命センター在室日数、死亡または生存について調査する。

4. 研究成果

(1) 研究A

登録患者 40 例中 15 例 (38%) に AKI の発症を認めた。AKI の誘因としては、急性循環不全 9 例、高ミオグロビン血症 2 例、その他 4 例であった。

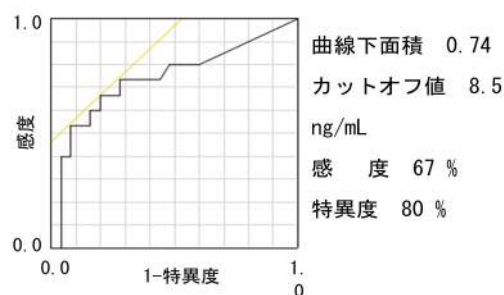
AKI 合併の有無での比較では、尿中 L-FABP には有意差を認めず (中央値 37.6 ng/mL vs 5.4 ng/mL, $p=0.06$)、尿中 NGAL は AKI 発症群で有意に高値であった (中央値 28.5 ng/mL vs 1.2 ng/mL, $p=0.01$)。ROC 分析では AKI 発症に対する NGAL のカットオフ値は 8.5 ng/mL であった (感度 67%、特異度 80%)。

重症救急患者には急性腎障害を合併する頻度が比較的高く、その早期診断には尿中 L-FABP よりも尿中 NGAL の有用性が高いと考えられた。

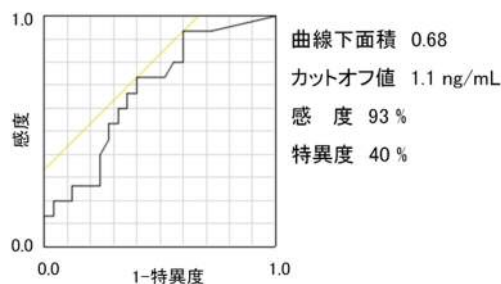
AKI発症の有無による群間比較

	AKI	非AKI	p値
症例数	15例	25例	
APACHE II	22 (17-31)	12 (5-17)	0.0008
ICU死亡	4 (27%)	0 (0%)	0.0149
血清Cr	1.2 (0.9-2.6)	0.8 (0.6-1.1)	0.0219
L-FABP	37.7 (3.8-157)	5.4 (0-66.9)	0.0641
NGAL	28.5 (1.5-76.8)	1.2 (0-4.9)	0.0101

AKI発症に対するNGALのカットオフ値 —ROC分析—



AKI発症に対するL-FABPのカットオフ値 —ROC分析—



(2) 研究B

本研究に登録された患者 20 例中 4 例 (20%) に AKI の発症を認めた。AKI の原因は循環不全が多数を占めていた。AKI 発症の有無による比較では、AKI 発症群は非発症群に比較して、尿中 L-FABP (中央値 284 ng/mL versus 30 ng/mL, $p=0.36$) と尿中 NGAL (中央値 459 ng/mL versus 37 ng/mL, $p=0.17$) は高い傾向にあったが、測定値のばらつきが大きく、統計学的に有意差を認めなかった。

AKI 発症群および非発症群の中から、総蛋

白量が同等の尿検体をそれぞれ1例ずつ選び、網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、368種類の蛋白質が検出された。この中には、AKI発症の有無によって有意差を認めるとともに、腎臓との関連が報告されている蛋白質もいくつか認められ、これらの蛋白質と急性腎障害の関連をさらに詳細に検討する予定である。

AKIの早期診断に有用な尿中バイオマーカーを確立するためには、さらなる研究が必要と考えられた。

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)

[学会発表] (計3件)

①笠岡俊志: Urinary biomarkers for the early detection of acute kidney injury. 第41回米国集中治療医学会. 2012年2月6日. ヒューストン (米国)

②笠岡俊志: 重症救急患者における急性腎障害の早期発見に対する尿中バイオマーカーの有用性. 第14回日本臨床救急医学会総会・学術集会. 2011年6月4日. 札幌(札幌コンベンションセンター)

③笠岡俊志: 重症救急患者における急性腎障害の早期発見に対する尿中バイオマーカーの有用性. 第2回 Japan AKI Summit. 2010年10月30日. 東京(品川インターシティ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠岡 俊志 (KASAOKA SHUNJI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90243667

(2) 研究分担者

前川 剛志 (MAEKAWA TSUYOSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60034972
(H21)

泉 友則 (IZUMI TOMONORI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00261694