

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591219

研究課題名(和文)腎移植時合併症の新規「早期診断・鑑別診断」バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of metabolomic biomarkers for early detection of acute kidney injury in kidney transplantation.

## 研究代表者

湯澤 由紀夫(YUZAWA, Yukio)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00191479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、これまでに急性腎障害(AKI)の発症を超早期に検出できるバイオマーカーとして尿中のミッドカインを発見し、その早期検出性能は血清クレアチニンやNGALと比べて優れていることを見出している。本研究では、腎移植後のAKIを早期に検出する診断技術の開発を目指して、病態基盤である虚血再灌流ストレスに基づくAKIについて代謝物レベルでの詳細な分子メカニズムの解明に取り組んだ。腎虚血再灌流を伴う手術において、経時的にサンプリングした尿を対象にして代謝物一斉解析を実施し、帰室後の虚血性AKIの発症を術前または術中から予測するバイオマーカー候補代謝物の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have established the level of urinary midkine as an early biomarker of acute kidney injury (AKI). Furthermore, recent advances on metabolomics allowed us to identify metabolomic biomarkers for prediction of AKI. This study aimed to develop metabolomics biomarkers for early detection of AKI after renal transplantation by elucidating the detailed molecular mechanism of AKI at the metabolite level. A simultaneous metabolomics analysis with capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry was conducted on urine samples from subjects who had undergone the surgery with renal ischemia reperfusion at the time of renal transplantation. Our metabolomic profiling identified novel biomarker candidates for early prediction of ischemic AKI in kidney transplantation.

研究分野：腎臓内科

キーワード：AKIバイオマーカー メタボローム解析 腎移植 AKI: acute kidney injury 急性腎傷害

### 1. 研究開始当初の背景

腎移植後の合併症として腎機能障害が起こることが知られているが、その病態は免疫拒絶反応と急性腎障害(AKI)に二分され、さらに AKI は免疫抑制剤等による薬剤性(腎毒性)AKI、虚血性 AKI および敗血症などに起因するその他の AKI に細分化される。これら合併症の有無は移植腎の生着率に大きな影響を及ぼし、合併症のコントロールは腎移植を成功させるうえで最も重要な要素である。

これまで、本申請者らは、非腎移植虚血性急性腎障害(AKI)の病態解明および診断用バイオマーカー開発に取り組み、Midkine が尿細管障害の Common pathway で重要な役割を担っていることを明らかにし(Sato W et al., JI 167, 3463-3469, 2001)、虚血性 AKI の超早期バイオマーカーとして尿中 Midkine が大変優れていることを発見した(Hayashi H et al., ERA/EDTA, 2008)。さらに、生体分析技術として極めて強力なメタボローム解析(全代謝物一斉解析)を AKI 研究分野に世界で初めて導入して、AKI の早期鑑別バイオマーカーだけでなく、AKI 発症リスク予測バイオマーカーも発見した(図 2B,C)。

### 2. 研究の目的

本研究では、平成 22 年の臓器移植法改正により今後益々増加する腎移植の成功率向上を見据えて、移植後合併症による腎機能低下の早期発見や迅速診断、ならびに、予後予測に有用なバイオマーカーを開発することを目標にして、メタボローム解析により尿中および血中の代謝物の中からバイオマーカー候補物質を探索する。

### 3. 研究の方法

申請者らが所属する施設にて施行された腎移植術患者、ならびに、腎移植後合併症の主たる病態基盤である虚血性 AKI を様々なレベルで発症した腎虚血再灌流を伴う手術を施行された患者のうち、倫理的な手続きを満たした患者を対象にして、術前、術中、および術後の尿および血漿を経時的に採取して分析サンプルとした。尿および血漿に含まれる代謝物の測定は、いわゆるメタボローム解析を用いた。すなわち、キャピラリー電気泳動装置に質量分析計を接続した CE-MS と呼ばれる分析装置に、内部標準物質を付加して前処理した先の検体をアプライして、おおよそ 1kDa 以下のイオン性小分子代謝物を網羅的に一斉解析した。

### 4. 研究成果

腎移植後合併症の主たる病態基盤である虚血再灌流ストレスによる虚血性 AKI に関して、これまでメタボローム(全代謝物)を俯瞰した解析結果の報告が無かったので、虚血性 AKI の代謝物レベルでの病態機序の一端を把握するために虚血性 AKI を発症した患者と

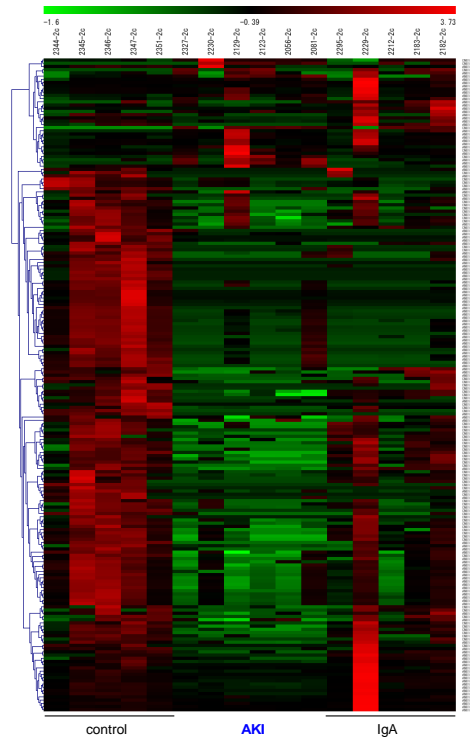


図 1.病態毎の尿中メタボローム濃度プロファイルの比較結果の一例。

IgA 腎症患者、ならびに、健常人の尿中メタボロームプロファイルと比較した。その結果、図 1 に示したような尿中メタボロームプロファイルが得られた。虚血性 AKI 患者の尿では、健常人のそれに比べて大部分の代謝物濃度が低下していた。IgA 腎症患者の尿との比較では、虚血性 AKI 患者の尿と濃度プロファイルが類似する代謝物群が認められ、これらの代謝物は病因に関係なく腎機能低下によって影響を受ける代謝物群である可能性のあることが示唆され、引き続き、対象疾患を変えて詳細な検討を試みている。

術中の腎臓の虚血再灌流ストレスにより術後に虚血性 AKI を発症した約 20 名の患者群を対象にした経時的なメタボロームプロファイル解析の結果、術後に発症する虚血性 AKI の重症度によって術前および術中の尿メタボロームプロファイルが異なることが判った。このことは、術前の尿メタボロームプロファイルから術後の虚血性 AKI の発症しやすさの有無だけでなく、発症したときの重症度まで予測できる临床上極めて有用なバイオマーカーを開発できる可能性を持っていると考え、さらなる精査を試みた。対象患者数を 200 名以上に拡大して、術前、術直後、ICU 入室時、術後 6h、12h、24h および 48h に尿検体を採取し、先と同様の方法にて尿メタボローム濃度プロファイルを解析した(図 2)。さらに、患者の予後別に非 AKI 群、軽度 AKI 群および重度 AKI 群に分けて、それらの患者群の中からそれぞれ 129、130 および 71 症例

をピックアップし、尿メタボロームプロファイルの詳細に解析した。

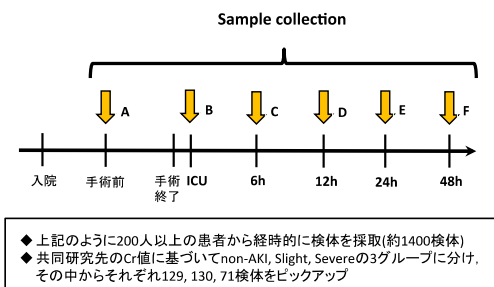


図 2 . 腎動脈閉鎖を伴う手術症例における検体採取スケジュールの一例。

約 300 種類の既知代謝物および 1000 ピーク以上の未知代謝物を対象にして、術前や術中から術後の予後を予測可能にするバイオマーカー候補代謝物群を抽出するために、種々のバイオインフォマティクスを駆使してメタボロームプロファイリングを行った(図 3)。その結果、重要な4種類を含む数種類の尿中代謝物を、術前から術後のAKIの発症の有無や重症度を予測するバイオマーカー候補として抽出することに成功した。これらの虚血性AKIの予後予測用バイオマーカー候補代謝物は移植後合併症例においても重要かつ有用になると容易に予想できる。今後、これら研究成果の知財化手続き、ならびに、他施設間での臨床試験の実施に向けた手続きを経て、ポイントを絞った詳細な検討を行い、臨床での実用化を目指す。

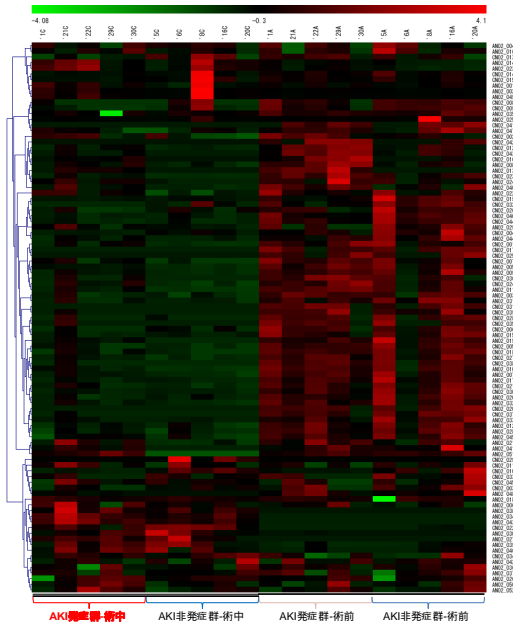


図 3 . 術後に AKI を発症した患者群と非発症患者群における術前および術中の尿中メタボローム濃度プロファイルの比較結果の一例。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

1. Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M, Hall SD, Poulsen K, Kilian M, Hiki Y, Yuzawa Y, Moldoveanu Z, Julian BA, Renfrow MB, Novak J. Enzymatic sialylation of IgA1 o-glycans: implications for studies of IgA nephropathy. PLoS One. 9(2). 2014 査読有
2. Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Tamai H, Hiramatsu T, Ohashi H, Ito I, Kasuga H, Horie M, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsubara T, Matsuo S; on behalf of the Nagoya Spiro Study Group. Long-Term Effects of Spironolactone in Peritoneal Dialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 25(5):1094-102 2014 査読有
3. Nagaya H, Kosugi T, Maeda-Hori M, Maeda K, Sato Y, Kojima H, Hayashi H, Kato N, Ishimoto T, Sato W, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Maruyama S. CD147/basigin reflects renal dysfunction in patients with acute kidney injury. Clin Exp Nephrol. 2013 Dec 4. [Epub ahead of print] 査読有
4. Shinjo H, Sato W, Imai E, Kosugi T, Hayashi H, Nishimura K, Nishiwaki K, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S. Comparison of Kidney Disease: Improving Global Outcomes and Acute Kidney Injury Network criteria for assessing patients in intensive care units. Clin Exp Nephrol. 2013 Nov 27. [Epub ahead of print] 査読有
5. Kojima H, Kosugi T, Sato W, Sato Y, Maeda K, Kato N, Kato K, Inaba S, Ishimoto T, Tsuboi N, Matsuo S, Maruyama S, Yuzawa Y, Kadomatsu K., Deficiency of growth factor midkine exacerbates necrotizing glomerular injuries in progressive glomerulonephritis., Am J Pathol. 182(2):410-9. 2013 査読有
6. 木村健二郎, 松尾清一, 湯澤由紀夫, 他 16名: "エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン2013 作成委員会, 日本腎臓学会誌, 55(5):585-860, 2013 査読無
7. Yasuda K, Ozaki T, Saka Y, Yamamoto T, Gotoh M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S,

Maruyama S., Autologous cell therapy for cisplatin-induced acute kidney injury by using non-expanded adipose tissue-derived cells., *Cytherapy*. 14(9):1089-100. 2012 査読有

8. Kato S, Lindholm B, Stenvinkel P, Ekström TJ, Luttrupp K, Yuzawa Y, Yasuda Y, Tsuruta Y, Maruyama S., DNA hypermethylation and inflammatory markers in incident Japanese dialysis patients. *Nephron Extra*. 2(1):159-68, 2012 査読有
9. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T., Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy., *Anal Bioanal Chem*. 404(10):3101-9, 2012 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. Yukio Yuzawa, Treatment of IgA nephropathy "The first comprehensive evidence-based clinical guideline for IgA nephropathy in Japan" . 1<sup>st</sup> Oxford Conference on IgA Nephropathy; 2014.6.25-26 Oxford, UK.
2. Yukio Yuzawa, AKI; diagnosis and future prospect "Organ drosstalk in acute kidney injury" . The 59th Congress of the Japanese Society for Dialysis Therapy; . 2014.7.4-6, Yokohama, Japan
3. Yukio yuzawa, Hiroki Hayashi, Midori Hasegawa. Acute Kidney Injury "Urinary Biomarker for Acute Kidney Injury (AKI)" . The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology; 2014.5.14-17Tokyo, Japan.
4. Midori Hasegawa, Junichi Ishii, Fumihiko Kitagawa, Hiroshi Takahashi, Kyoko Kanayama and Yukio Yuzawa Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular events in chronic kidney disease., *World Congress of Nephrology 2013*: May 31 - June 4, 2013, Hong Kong
5. Kazuo Takahashi, Ayako Kondo, Daisuke Hirano, Shin'ichi Akiyama, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Midori

Hasegawa, Yoshiyuki Hiki, Shunji Yoshida, Keiji Miura, Yukio Yuzawa, IgA Antibodies to Glomerular Endothelial Cells in Patients with Lupus Nephritis: Correlations with Renal Injury., *Kidney Week 2013 (American Society of Nephrology)*: Nov 5-10, 2013, Atlanta,Georgia,USA

6. Midori Hasegawa, Kyoko Hattori, Kazuo Takahashi, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Yukio Yuzawa. A Retrospective Study on Outcome of MPO-ANCA Associated Vasculitis in Renal Replacement Therapy., *Kidney Week 2013 (American Society of Nephrology)*: Nov 5-10, 2013, Atlanta,Georgia,USA
7. Hiroki Hayashi, Sachiyo Suzuki, Kensuke Kataoka, Yasuhiro Kondoh, Hiroyuki Taniguchi, Daisuke Sugiyama, Kunihiro Nishimura, Waichi Sato, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo, Yukio Yuzawa: "Distant Effects of AKI on Lung Injuries by Soluble Mediators in Broncho-Alveolar Lavage Fluid in Patients with Acute Lung Injury / Acute Respiratory Distress Syndrome." ERA-EDTA Congress 2012. (2012.05.24-2012.05.27). Paris, France
8. 湯澤由紀夫: "教育講演「AKIのバイオマーカー」" 第42回日本腎臓学会西部学術大会(招待講演). (2012.10.26-2012.10.27). 沖縄県宜野湾市
9. 湯澤由紀夫: "ランチョンシンポジウム2: 臓器連関障害を救済するための急性血液浄化療法の位置付け" 第23回日本急性血液浄化学会学術集会(招待講演). (2012.10.27-2012.10.28). 埼玉県大宮市

〔図書〕(計3件)

1. 湯澤 由紀夫, 長谷川 みどり, 林 宏樹, 【尿検査教本 From 2013】(第1章)総論 急性腎障害AKIの考え方と尿バイオマーカー; 臨床病理レビュー (1345-9236)149号 Page31-38(2013.03)
2. 湯澤由紀夫, 林宏樹: "Annual Review 腎臓 2012: 2. 肺・腎連関 CKDにおけるRAS活性化を介する機能的な腎・肺連関 Critical Care Nephrology における腎・肺クロストーク AKI後のALI/ARDS発症に重要な因" 中外医学社. 10

(2012)

3. 林 宏樹, 湯澤由紀夫: "EBM 腎臓病の  
治療 2011-2012: III 急性腎不全 1. 急  
性腎不全のバイオマーカーは何がよい  
でしょうか?" 中外医学社. 6 (2012)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯澤 由紀夫 (YUZAWA, Yukio)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号: 00191479

### (2) 研究分担者

秋山真一 (AKIYAMA, Shin'ichi)  
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・  
講師  
研究者番号: 20500010

林 宏樹 (HAYASHI, Hiroki)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号: 10378086

長谷川みどり (HASEGAWA, Midori)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号: 40298518

日下 守 (KUSAKA, Mamoru)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号: 40309141

丸山彰一 (MARUYAMA, Shoichi)  
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号: 10362253

佐藤和一 (SATO, Waichi)  
藤田保健衛生大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90508920

曾我朋義 (SOGA, Tomoyoshi)  
慶応義塾大学・環境情報学部・教授  
研究者番号: 60228217