慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	臨床応用を指向した腎疾患病型スクリーニング法の開発
Sub Title	Development of renal disease type screening method for clinical application
Author	平山, 明由(Hirayama, Akiyoshi) 丸山, 彰一(Maruyama, Shōichi)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	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中に含まれる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。 その結果、ループス腎炎を判別するための新規バイオマーカーを同定するとともに、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。 In this study, a comprehensive analysis of urinary 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 is possible to identify a novel biomarker for discriminating lupus nephritis and to create a model for discriminating a specific disease from 7 types of nephrotic diseases by combining 2 to 5 kinds of metabolites.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2018～2020 課題番号：18K08219 研究分野：メタボロミクス、分析化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K08219seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０８２１９

研究課題名（和文）臨床応用を指向した腎疾患病型スクリーニング法の開発

研究課題名（英文）Development of renal disease type screening method for clinical application

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）　　3,400,000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中に含まれる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。
その結果、ループス腎炎を判別するための新規バイオマーカーを同定するとともに、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で得られた新規バイオマーカーは、ループス腎炎の早期診断に使用できるのみならず、治療薬開発や治療効果の判定に役立つ可能性がある。尿は非侵襲に採取できるため、メタボローム解析と組み合わせることによって、より広範な疾患のスクリーニングに使える可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, a comprehensive analysis of urinary 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 is possible to identify a novel biomarker for discriminating lupus nephritis and to create a model for discriminating a specific disease from 7 types of nephrotic diseases by combining 2 to 5 kinds of metabolites.

研究分野：メタボロミクス、分析化学

キーワード：ネフローゼ　メタボローム解析　尿　バイオマーカー

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在、腎疾患の鑑別診断を行うため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検査である。尿中に含まれる低分子化合物を網羅的に測定するメタボローム解析を適用することによって、本当に腎生検が必要な患者をあらかじめ選別することが可能なスクリーニング法が開発できれば、不要な検査を削減できる可能性があり、患者の侵襲的負担のみならずコストの面からも臨床的価値が非常に大きい。しかしながら、これまで行われてきたメタボローム解析は、検体数が少なく十分なバリデーションも取られていないなどの問題点もあったため、臨床応用するには不十分であった。さらに、解析途中で有望なマーカー候補物質が見つかっても、これを同定する技術が未発達であるために、そのまま放置されるケースがほとんどであった。

２．研究の目的

先行研究で得られた各種腎疾患を判別するマーカー候補について、物質同定を行うための要素技術の開発、ならびに疾患判別マーカー・モデルのバリデーションを行う。最終的には、単一の方法で複数のマーカーを測定する方法を開発し、臨床応用可能な疾患判別モデルを確立することを目的とする。

３．研究の方法

（１）研究に用いた尿サンプル

研究分担者の所属する名古屋大学医学部付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）サンプル前処理

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。

（３）CE-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

1）陽イオン性代謝物質測定条件　（参考文献 1,2 参照）

①キャピラリー電気泳動（CE）の分析条件

キャピラリーには、フューズドシリカキャピラリー（内径 50 μm、外径 360 μm、全長 100 cm）を用いた。緩衝液には、1 M ギ酸（pH 約 1.8）を用いた。印加電圧は、+30 kV、キャピラリー温度は 20℃で測定した。試料は、加圧法を用いて 50 mbar で 3 秒間注入した。

②飛行時間型質量分析計（TOFMS）の分析条件

正イオンモードを用い、イオン化電圧は 4 kV、フラグメンター電圧は 75 V、スキマー電圧は 50 V、OctRFV 電圧は 125 V に設定した。乾燥ｶﾞｽには窒素を使用し、温度 300℃、圧力 10 psig に設定した。シース液は 50%メタノール溶液を用い、質量較正用にヘキサキス(2,2-ジフルオロトキシ）フォスファゼンを 0.1 μM となるよう混入し 10 μL/min で送液した。ヘキサキス（2,2-ジフルオロトキシ）フォスファゼン（m/z 622.0290）とメタノールの二量体のアイソトープ（m/z 66.0632）の質量数を用いて得られた全てのデータを自動較正した。

2）陰イオン性代謝物質測定条件　（参考文献 3 参照）

①キャピラリー電気泳動（CE）の分析条件

キャピラリーには、COSMO(+)キャピラリー（内径 50 μm、外径 360 μm、全長 100 cm）を用いた。緩衝液には、50 mM 酢酸アンモニウム（pH 8.5）を用いた。印加電圧は、-30kV、キャピラリー温度は 20℃で測定した。試料は、加圧法を用いて 50 mbar で 30 秒間注入した。

②　飛行時間型質量分析計（TOFMS）の分析条件

負イオンモードを用い、イオン化電圧は 3.5 kV、フラグメンター電圧は 100 V、スキマー電圧は 50 V、OctRFV 電圧は 200 V に設定した。乾燥ｶﾞｽには窒素を使用し、温度 300℃、圧力 10 psig に設定した。シース液は 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 50%メタノール溶液を用い、質量較正用にヘキサキス（2,2-ジフルオロトキシ）フォスファゼンを 0.1 μM となるよう混入し 10 μL/min で送液した。レゼルピンの酢酸付加イオン（m/z 680.0355）と酢酸の二量体のアイソトープ（m/z 120.0384）の質量数を用いて得られた全てのデータを自動較正した。

４．研究成果

（１）尿のメタボローム解析

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、標準化合物によって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。

（２）バイオマーカー候補の同定

得られた各ピークに対して、7 種のネフローゼ症候群から 1 つの疾患を判定するためのマーカー候補の探索を統計学的に実施した。その結果、ループス腎炎特異的に増加する代謝物ピークを抽出した（図 1）。

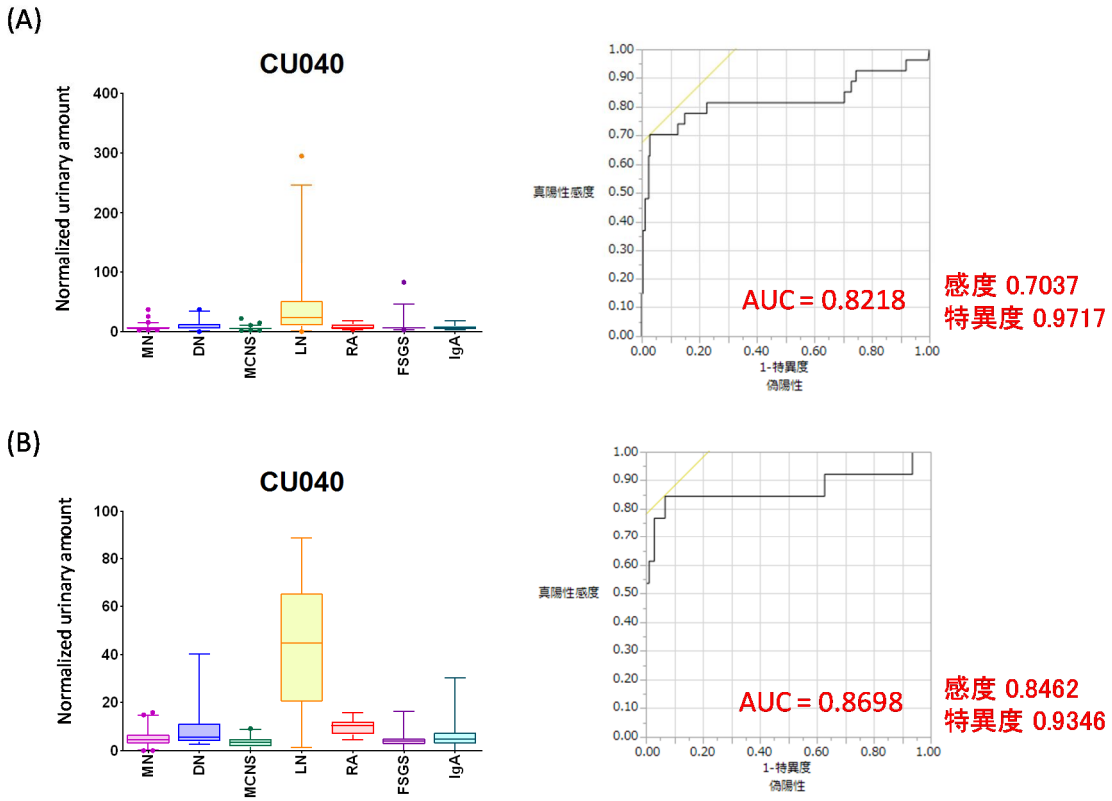

図 1　ネフローゼ症候群における尿中 CU040（未知ピーク）の蓄積量（左）とループス腎炎の鑑別能（右）　(A) 探索コホート 274 検体; (B) バリデーションコホート 120 検体
MN, 膜性腎症; MCNS, 微小変化型ネフローゼ症候群; DN, 糖尿病性腎症; FSGS, 巣状糸球体硬化症; LN, ループス腎炎; RA, アミロイド腎症; IgA, IgA 腎症

この代謝物ピークは、探索コホート、バリデーションコホートどちらにおいても高い判別能を示すことが分かり、ループス腎炎の良いマーカー候補であると考えられた。しかしながら、このピークは該当する標準試薬が無かったために同定ができなかった。そこで、分取液体クロマトグラフィーによる代謝物の回収、および核磁気共鳴による同定を試みた。

その結果、代謝物ピークの同定に成功し、試薬メーカーに当該化合物の合成を依頼した。合成した試薬と分取した代謝物の同一分析条件における保持時間、ならびにタンデムマススペクトルを比較した結果、両者が一致したため、最終的に 3’, 4’-didehydro-3’-deoxycytidine と同定した（図 2）。

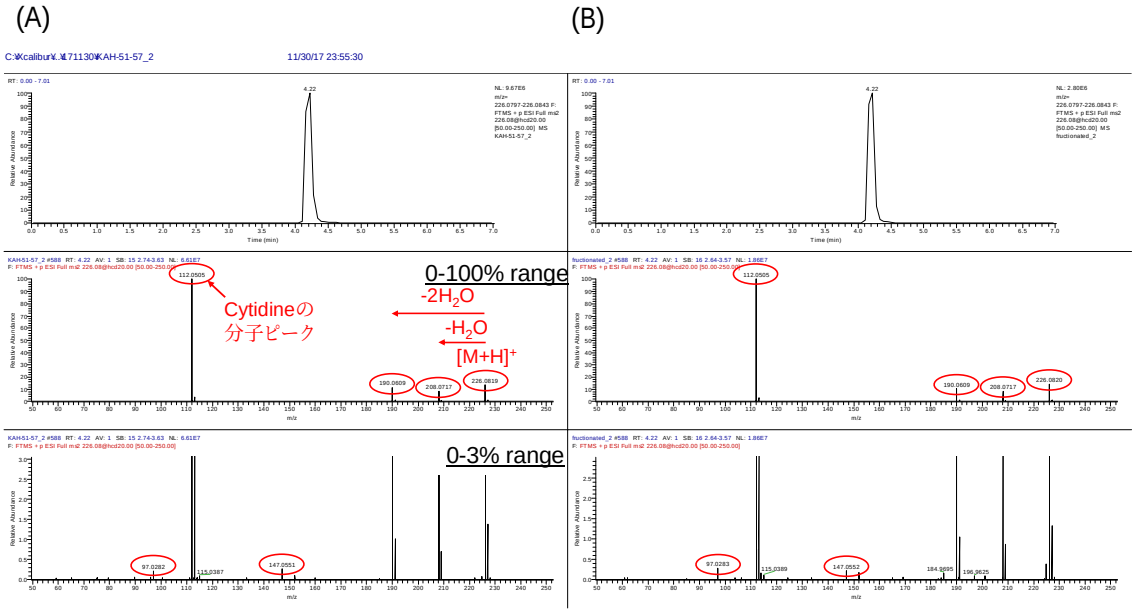

図 2　合成試薬(A)と分取した代謝物(B)のクロマトグラムおよびタンデムマススペクトル

（3）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成

一部の疾患に対しては、単独の代謝物で精度良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、多くの疾患では単独の代謝物のみでは判別が困難であった。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）を作成することにより判別精度を上げることを検討した。

図 3 に、今回作成したモデルの結果を示す。一部の疾患では例外であったが、2～5 種の代謝物を組み合わせることによって精度良く特定の疾患判別が可能であった。

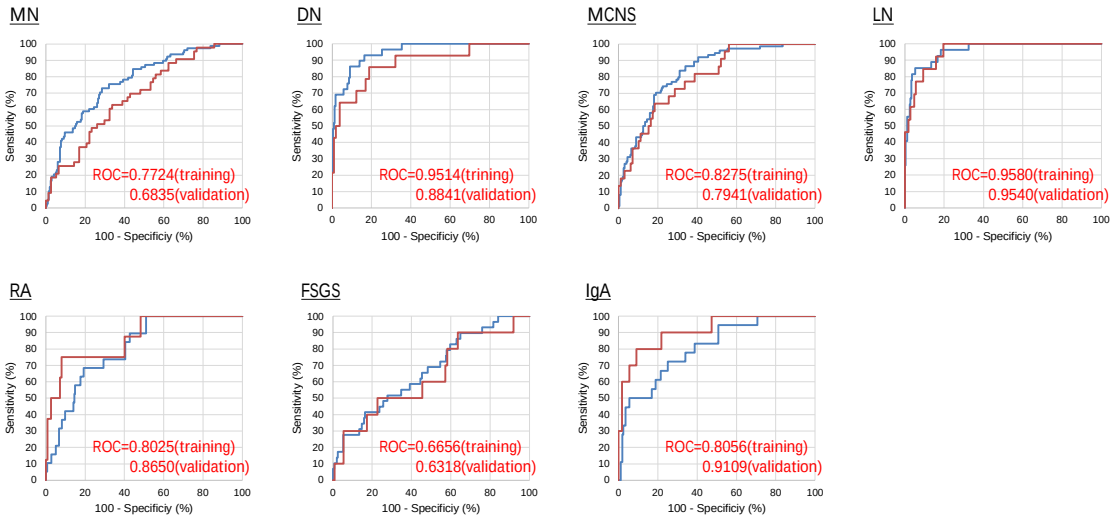

図 3　ロジスティック回帰モデルを用いた疾患判別モデルの作成

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Krycer James R.、Quek Lake-Ee、Francis Deanne、Fazakerley Daniel J.、Elkington Sarah D.、Diaz-Vegas Alexis、Cooke Kristen C.、Weiss Fiona C.、Duan Xiaowen、Kurdyukov Sergey、Zhou Ping-Xin、Tambar Uttam K.、Hirayama Akiyoshi、Ikeda Satsuki、Kamei Yushi、Soga Tomoyoshi、Cooney Gregory J.、James David E.	４．巻 295
２．論文標題 Lactate production is a prioritized feature of adipocyte metabolism	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 83～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011178	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 該当する

１．著者名 Hirayama Akiyoshi、Tabata Sho、Kudo Ryuhei、Hasebe Masako、Suzuki Kumi、Tomita Masaru、Soga Tomoyoshi	４．巻 1619
２．論文標題 The use of a double coaxial electrospray ionization sprayer improves the peak resolutions of anionic metabolites in capillary ion chromatography-mass spectrometry	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Chromatography A	６．最初と最後の頁 460914～460914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chroma.2020.460914	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 Ozawa Hitoshi、Hirayama Akiyoshi、Ishikawa Takamasa、Kudo Ryuhei、Maruyama Midori、Shoji Futaba、Doke Tomohito、Ishimoto Takuji、Maruyama Shoichi、Soga Tomoyoshi、Tomita Masaru	４．巻 92
２．論文標題 Comprehensive Dipeptide Profiling and Quantitation by Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Analytical Chemistry	６．最初と最後の頁 9799～9806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c01258	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 Ozawa Hitoshi、Hirayama Akiyoshi、Shoji Futaba、Maruyama Midori、Suzuki Kumi、Yamanaka-Okumura Hisami、Tatano Hiroshi、Morine Yuji、Soga Tomoyoshi、Shimada Mitsuo、Tomita Masaru	４．巻 10
２．論文標題 Comprehensive Dipeptide Analysis Revealed Cancer-Specific Profile in the Liver of Patients with Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Metabolites	６．最初と最後の頁 442～442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo10110442	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 －

１．著者名 Hayasaka Ryosuke、Tabata Sho、Hasebe Masako、Ikeda Satsuki、Ohnuma Sumiko、Mori Masaru、Soga Tomoyoshi、Tomita Masaru、Hirayama Akiyoshi	４．巻 11
２．論文標題 Metabolomic Analysis of Small Extracellular Vesicles Derived from Pancreatic Cancer Cells Cultured under Normoxia and Hypoxia	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Metabolites	６．最初と最後の頁 215～215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011178	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4件（うち招待講演　2件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 平山明由、秋山真一、丸山彰一、曽我朋義
２．発表標題 メタボロミクスによるネフローゼ症候群の尿中バイオマーカー探索
３．学会等名 第68回　質量分析総合討論会
４．発表年 2020年

１．発表者名 平山　明由
２．発表標題 メタボロミクスと疾患研究
３．学会等名 第36回　和漢医薬学会学術大会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Akiyoshi Hirayama
２．発表標題 Metabolomics in biology research
３．学会等名 第42回　日本分子生物学会年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 平山明由
２．発表標題 メタボローム解析技術を用いた糖尿病腎症をはじめとする各種腎疾患のバイオマーカー探索
３．学会等名 第61回　日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計2件

産業財産権の名称 全身性エリテマトーデスの検出方法	発明者 平山明由、曽我朋義、丸山彰一、秋山真一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/051066	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 全身性エリテマトーデスの検出方法	発明者 平山明由、曽我朋義、丸山彰一、秋山真一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-242371	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕　計0件

〔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
研究分担者	丸山　彰一 (MARUYAMA Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

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