

Title	高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索
Sub Title	Development of alternative metabolomic signatures that accurately predict renal function by metabolomics
Author	岡崎, 仁美(Okazaki, Hitomi)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.266- 270
JaLC DOI	
Abstract	メタボロームとは、生体内に含まれる糖やアミノ酸、脂肪酸、有機酸といった低分子化合物の総体を指す用語である。近年では網羅的にメタボロームを測定し、生体内のメカニズムを明らかにするメタボローム解析が発展し、食品、医療、環境など多くの分野で用いられている。卒業論文では、メタボローム解析を用いた「鶴岡メタボロームコホート研究における食習慣と血漿中代謝物の関係」と「高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索」について報告している。なお、本卒業論文ダイジェストでは「高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索」について述べる。糸球体濾過量(Glomerular Filtration Rate ; GFR)とは、日本人の8人に1人が罹患している慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease ; CKD)を評価する診断指標の一つである。また、GFRはCKDの重症度の評価にも用いられている。現在、GFR測定の国際標準法はイヌリンクリアランス測定である。しかし、イヌリンクリアランス測定は多くの時間と労力を要する。そのため、医療現場では血清クレアチニン値や血清シスタチンC値から算出する推定糸球体濾過量(estimated GFR ; eGFR)が用いられている。しかしながら、血清クレアチニン値は筋肉量や肝機能によって、血清シスタチンC値は甲状腺機能やウイルス感染等によって濃度が変化するため、eGFRがGFRを正確に反映しているとは言い難いのが現状である。そこで、eGFRで腎機能を評価できない部分を補強する新しいバイオマーカーを探索する必要があると考えた。本研究はイヌリンクリアランスのわかっている173人の血漿と尿の代謝物をキャピラリー電気泳動 - 質量分析法(capillary electrophoresis-mass spectrometry ; CE-MS)用いて測定し、イヌリンクリアランスとの相関を求めた。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0266

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.

高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索

Development of alternative metabolomic signatures that accurately predict renal function by metabolomics

環境情報学部 4 年

岡崎仁美

要旨

メタボロームとは、生体内に含まれる糖やアミノ酸、脂肪酸、有機酸といった低分子化合物の総体を指す用語である。近年では網羅的にメタボロームを測定し、生体内のメカニズムを明らかにするメタボローム解析が発展し、食品、医療、環境など多くの分野で用いられている。卒業論文では、メタボローム解析を用いた「鶴岡メタボロームコホート研究における食習慣と血漿中代謝物の関係」と「高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索」について報告している。なお、本卒業論文ダイジェストでは「高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカーの探索」について述べる。糸球体濾過量 (Glomerular Filtration Rate; GFR) とは、日本人の 8 人に 1 人が罹患している慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) を評価する診断指標の一つである。また、GFR は CKD の重症度の評価にも用いられている。現在、GFR 測定の国際標準法はイヌリンクリアランス測定である。しかし、イヌリンクリアランス測定は多くの時間と労力を要する。そのため、医療現場では血清クレアチニン値や血清シスタチン C 値から算出する推定糸球体濾過量 (estimated GFR; eGFR) が用いられている。しかしながら、血清クレアチニン値は筋肉量や肝機能によって、血清シスタチン C 値は甲状腺機能やウイルス感染等によって濃度が変化するため、eGFR が GFR を正確に反映しているとは言い難いのが現状である。そこで、eGFR で腎機能を評価できない部分を補強する新しいバイオマーカーを探索する必要があると考えた。本研究はイヌリンクリアランスのわかっている 173 人の血漿と尿の代謝物をキャピラリー電気泳動-質量分析法 (capillary electrophoresis-mass spectrometry; CE-MS) 用いて測定し、イヌリンクリアランスとの相関を求めた。

キーワード：メタボローム解析，GFR，バイオマーカー，CE-MS

1. 背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) は日本人の 8 人に 1 人が罹患しており、新たな国民病といわれている (CKD 診療ガイド 2012). また、CKD は心血管疾患の危険因子であることがわかっている (Koeda *et al.*, 2014). したがって、CKD を早期に発見し、治療することは腎機能の悪化だけでなく、合併症も防ぐことができる.

日本において、CKD は①尿異常、画像診断、血液、病理で腎障害の存在が明らかである. 特に 0.15 g/g Cr 以上の蛋白尿 (30 mg/g Cr 以上のアルブミン尿) が存在している. ②腎臓にある糸球体で濾過された血液の量つまり、糸球体濾過量 (Glomerular Filtration Rate; GFR) が 60 mL/分/1.73 m² 未満である. この①、②のいずれか、または両方が 3 か月以上持続している状態のことをいう. また、CKD の重症度は原疾患、GFR、蛋白尿を組み合わせた 6 つのステージによって評価されている. 現在、GFR 測定の国際標準法、つまりゴールドスタンダードは外因性物質であるイヌリンから算出した inulin clearance (C_{in}) を用いた方法である. しかし、これは多くの時間と労力を要し、患者への負担が大きいので、血清 Creatinine 値、血清 Cystatin C 値から算出する推定糸球体濾過量 (estimated GFR; eGFR) が広く用いられている (Matsuo *et al.*, 2009; Horio *et al.*, 2013). また、血清 Creatinine 値、血清 Cystatin C 値から算出した eGFR の平均値が用いられることもある (CKD 診療ガイド 2012). しかしながら、血清 Creatinine 値は筋肉や食事摂取量、肝機能によって、血清 Cystatin C 値は甲状腺機能やウイルス感染によって濃度が変化するため、eGFR が GFR を正確に反映しているとは言い難いのが現状である (Adachi *et al.*, 2015; Jayagopal *et al.*, 2003; Collé *et al.*, 1992). そこで、現在用いられている eGFR で腎機能の評価できない部分を補強する新しいバイオマーカーを探索する必要があると考えた.

代謝物は生理学、病理学において重要な指標となっている (Nicholson and Wilson, 2003). 糸球体は血漿を濾過するという役割を果たしている (Tryggvason and Wartiovaara, 2005). 特に、糸球体基底膜はサイズバリアとチャージバリアの役割がある (Brenner *et al.*, 1978). この基底膜では、中性物質の糸球体通過に比べ負電荷をもつ物質の通過は制限される一方、正電荷を持つ物質は同じサイズの中性物質に比べ多く通過する. したがって、腎機能に関するバイオマーカーを探索する際に、血漿のイオン性の代謝物を調べることは極めて重要である.

そこで、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置 (capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry; CE-TOFMS) を用いて血漿のイオン性の代謝物質の測定と解析を行った.

2. 対象と手法

2.1. 対象

本研究は名古屋大学医学部腎臓内科で採取された 173 人の血漿を用いた。この血漿は空腹時の、インスリンクリアランス測定の際に採取されたものである。表 1 に対象者の身体的特徴を示した。本研究は中年層が多く、平均年齢は 59.5 歳となった。また、男性 86 人、女性は 87 人であった。GFR が 60 mL/min/1.73 m²以上の人は 84 人に対し、慢性腎臓病と診断される 60 mL/min/1.73 m²未満の人は 89 人であった。

表 1. 対象者の身体的特徴

	N=173
Male/Female (N)	86/87
Age (years)	59.5±10.9
Height (cm)	161.5±8.1
Weight (kg)	62.7±11.3
BMI (kg/m ²)	23.9±3.3
Hypertension (N)	108
Diabetes (N)	30
Hyperlipidemia (N)	95
eGFR _{cr}	60.9±24.5
eGFR _{cys}	64.5±26.9
C _{in}	59.4±26.7
15 > (N)	8
15-29 (N)	21
30-44 (N)	28
45-59 (N)	32
60-89 (N)	60
90 ≤ (N)	24

連続変数の数値は平均値±標準偏差を示し、カテゴリー変数の数値は人数を示している。

2.2. 血漿の前処理

血漿を軽く攪拌した後、9,100 ×g, 4°C にて 1 分間遠心機にかけた。この血漿 50 μL と 20 μmol/L の Methionine Sulfone, D-Camphor-10-Sulfonic Acid, 2-morpholinoethanesulfonic Acid が入った Methanol 溶液 450 μL をチューブに入れ、攪拌した。次に、このチューブに Chloroform を 500 μL, Milli-Q 水を 200 μL 加え、30 秒攪拌した後、9,100 ×g, 4°C にて 3 分間冷却遠心した。その後、上清を 300 μL 取り、限外濾過カラムに入れ、9,100 ×g, 20°C にて 2.5 時間遠心した。このろ液を 40°C で 2.5 時間濃縮した。最後に 200 μmol/L の 3-Aminopyrrolidine, Trimesate が入った Milli-Q 水を 50 μL 入れて溶解した。

2.3. 測定とデータ処理

CE-TOFMS による測定は Anion mode, Cation mode とともにを行った. Anion mode では長さ約 105 cm の陽イオンポリマーで覆われた COSMO(+)キャピラリー (Nacalai Tesque) を用いて陰イオン物質を分離した. また, 50 mmol/L の酢酸アンモニウム (pH8.5) を電解液として用いた. はじめに, キャピラリーを 10 分間電解液で洗浄した後, 50 mmol/L の酢酸 (pH3.4) で 10 分間, そして再び電解液で 10 分間洗浄し, 測定を行った. 測定の際には, サンプル毎に 50 mmol/L の酢酸 (pH3.4) で 2 分間, 電解液で 5 分間洗浄することによりキャピラリー内を平衡にした. 前処理を終えたサンプル約 3 nL を 5 kPa で 30 秒間注入し, キャピラリーに -30 kV の電圧をかけることによって陽イオン物質を分離させた. 0.01 μ mol/L の Hexakis と 5 mmol/L の酢酸アンモニウムが入った Methanol/Milli-Q 水 (50% v/v) である Sheath 液を 10 μ L/min で送液すると同時に 300°C の窒素ガスの圧を 7 psig にすることにより, 分離させた陽イオン物質を TOFMS に送った. TOFMS の fragmenter, voltage, skimmer voltage, octapole radio frequency voltage の電圧をそれぞれ 100V, 50 V, 200V に設定した. また, 得られたスペクトルをリファレンス物質の精密質量で自動的に補正した. Anion mode のリファレンス物質は質量電荷比が 120.03834 である脱プロトン化された酢酸二量体の ^{13}C 同位体 ($2\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}$)⁻ と 680.03554 である Hexakis ($\text{M} + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}$)⁻ に脱プロトン化された酢酸が付加した物質を用いた.

Cation mode では電解液である 1 mol/L のギ酸 (pH 1.8) を満たした長さ約 100 cm のフューズドシリカキャピラリーで陽イオン物質を分離した. はじめに, キャピラリーを 20 分間電解液で洗浄した後に, 測定を行った. また, サンプル毎に電解液で 4 分間洗浄しキャピラリー内を平衡にした. 前処理を終えたサンプル約 3 nL を 5 kPa で 5 秒間注入し, 30 kV の電圧をかけた. 0.01 μ mol/L の hexakis-(2,2-difluorothoxy)-phosphazene が入った Methanol/Milli-Q 水 (50% v/v) である Sheath 液を 10 μ L/min で送液すると同時に 300°C の窒素ガスの圧を 7 psig にすることにより, 分離させた陽イオン物質を TOFMS に送った. TOFMS の fragmenter, voltage, skimmer voltage, octapole radio frequency voltage の電圧をそれぞれ 75V, 50 V, 125V に設定した. また, 得られたスペクトルをリファレンス物質の精密質量で自動的に補正した. Cation mode のリファレンス物質は質量電荷比が 66.06306 であるプロトン化されたメタノール二量体の ^{13}C 同位体 ($2\text{MeOH} + \text{H}$)⁺ と 622.02896 であるプロトン化された Hexakis ($\text{M} + \text{H}$)⁺ を用いた.

測定したデータから MasterHands ver2.17.0.10 を用いてピークの検出や積分, 代謝物質濃度の定量を行った. この際, 各ピークの同定は標準物質の質量電荷比 (m/z) と検出時間 (MT) を, 定量は標準物質の面積と比較して行った(Hirayama *et al.*, 2012).

2.4. 統計的解析

論文・特許申請前のため非公開.

3. 結果と議論

論文・特許申請前のため非公開.

謝辞

親身になりご指導してくださったアドバイザーである慶應義塾大学先端生命科学研究所の平山明由氏, CE-TOFMS や MasterHands の使い方を教えてくださった池田五月氏, 鈴木麻子氏, 鈴木千鶴氏, 工藤竜平氏, 石川貴正氏, 臨床の立場から様々なアドバイスをくださった名古屋大学医学部腎臓内科の丸山彰一氏, 安田宜成氏, 秋山真一氏に心より感謝申し上げます。また, このような研究環境や機会を与えてくださった富田勝氏に深く感謝申し上げます。

参考文献

日本腎臓学会編. (2012) CKD 診療ガイド 2012.

Adachi M, Tanaka A, Aiso M, Takamori Y, Takikawa H (2015) The benefit of cystatin C in evaluation of renal function and prediction of survival in patients with cirrhosis. *Hepatol Res* DOI:10.1111/hepr.12508.

Brenner BM, Hostetter TH and Humes HD.(1978) Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol* 234(6): F455–460.

Collé A, *et al.* (1992) Cystatin C levels in sera of patients with human immunodeficiency virus infection. A new avidin-biotin ELISA assay for its measurement. *J Immunoassay* 13(1):47–60.

Hirayama A, *et al.* (2012) Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem* 404(10): 3101–3109.

Horio M, *et al.* (2013) GFR estimation using standardized serum cystatin C in Japan. *Am J Kidney Dis* 61(2):197–203.

Jayagopal V, Keevil BG, Atkin SL, Jennings PE, Kilpatrick ES (2003) Paradoxical changes in cystatin C and serum creatinine in patients with hypo- and hyperthyroidism. *Clin Chem* 49(4):680–681.

Koeda Y, *et al.* (2014) Usefulness of risk grading system using albuminuria for predicting cardiovascular events and all-cause death in chronic kidney disease: a population-based prospective cohort study in Japan. *Int J Cardiol* 175(3):576–577.

Matsuo S, *et al.* (2009) Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* 53(6):982–992.

Nicholson JK, Wilson ID (2003) Opinion: understanding ‘global’ systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2(8):668–676.

Tryggvason K, Wartiovaara J (2005) How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda)* 20:96–101.