

液体クロマトグラフィー質量分析法と多変量解析を用いた 腎疾患関連バイオマーカー探索

松村 有里子

1 はじめに

血液や尿などの体液や組織には、生物が生命活動を行う上で代謝される多くの物質が含まれている。これらの物質はメタボライト (metabolite) と呼ばれ、運動や飲食等の影響を受けて濃度や化学構造が変化するものが存在する。特に、特定の病状や生命体の状態を知る指標となる化合物を生物指標化合物 (バイオマーカー) と呼び、血液や尿に含まれる代謝物をターゲットとした研究が活発に行われている。生命現象を包括的に解明することを目的とした学問領域であるオミクス (omics) 研究において、生体中に存在する分子全体を対象として網羅的な解析からバイオマーカーの探索が行われることが多い。対象とする分子が遺伝子の場合はゲノミクス (genomics)、タンパク質の場合はプロテオミクス (proteomics)、代謝物の場合はメタボロミクス (metabolomics)、転写物の場合はトランスクリプトミクス (transcriptomics) と呼ばれる。また、相互作用を対象としたインタラクトミクス (interactomics) や表現型を網羅的に調べるフェノミクス (phenomics) もある。オミクス研究における解析には核磁気共鳴分光法 (NMR) や各種質量分析から得られたデータが利用され、多変量解析等の統計手法が用いられている。メタボロミクスでは、主に血液中に存在するアミノ酸、糖、脂質などの低分子量の代謝物や、核酸やタンパク質の分解物が対象とされており、これらの網羅的な定量解析のために対象とする代謝物に適した質量分析装置の構成が選択されている。

メタボロミクスにおいて測定する試料は生体成分由来であるため、分析対象となる代謝物を検体から効率的に抽出して測定試料とする必要がある。生体からの検体採取方法や測定までの試料の保存方法、前処理や誘導体化等、統計解析を行う際には手技の煩雑さによるデータのばらつきが生じる可能性が高い。また、検体および試料の保存や前処理において、凍結・融解の回数をできるだけ少なくするように取り扱うことが質の良い分析結果を得るのに重要なポイントであり、検体の取り扱いには細心の注意を払う必要がある。

質量分析結果を用いたバイオマーカー探索では、分析元となるデータには、検出されるシグナルの溶出時間、検出モード、質量数、イオン強度など実によくの変数を

含んでいる。また、サンプルが生体由来であるため検出されるシグナルの数も実に多い。この莫大なデータからバイオマーカー候補を推定するには統計学的手法を駆使する必要がある。その一つとして多変量解析 (multivariate analysis) が用いられている。多変量解析はデータ集から主要因子となるデータを見つけ出すために用いられる解析手法である。主成分分析 (principle component analysis : PCA) では、主成分スコアからデータがどのようなパターンを示しそのパターンから外れる値の存在を確認することができ、判別分析 (partial least square) では、多くの変数に関するデータを分析者の仮説に基づいて関連性を明確にすることができる。多変量解析法を用いた定性・定量分析については分析化学会誌¹⁾をはじめ多くの論文や解説書があるので適宜参照されたい。バイオマーカー探索では、正常と異常といった2群間の差が最大となるようにモデルを考える判別分析として、部分最小二乗判別分析 (PLS-DA) やその改良版の OPLS-DA などが用いられる。本稿では、慢性腎臓病の早期発見のためのバイオマーカー探索について紹介する。

2 腎疾患関連バイオマーカーの探索

腎臓は、水分や電解質バランスの調節、血液を pH 7.4 に保つ、造血刺激ホルモンの分泌、血圧の調整、不要になったホルモンの分解・排泄等の生命の恒常性の維持を担う臓器である。特に重要な働きとして、腎臓の中の糸球体において血液中の老廃物や塩が濾過され、尿として対外に排出するということがある。しかし、腎機能が多少低下しても自覚症状が出ないことから沈黙の臓器とも呼ばれており、その機能が一度失われると再生することがない。数か月から数年の経過で排泄能や調節機能に障害が起こる病気を慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) といい、糸球体濾過値 (glomerular filtration rate : GFR) の低下とともに体液の恒常性が失われ、最終的には尿毒症と呼ばれる一連の症状を呈する病気となる。微量アルブミン尿や蛋白質尿^{たんぱく}で異常がみられた後、徐々に腎機能が低下して末期腎不全 (ESRD) に進行し、透析治療が必要となる。さらに悪化すると腎移植が必要となる。通常、年齢、性別、血中クレアチニン濃度から推定される推定糸球体濾過量 (eGFR) から腎機能は評価され、五つのカテゴリー (ステージ 1~5) に

分類される。ステージ3以上であるか、または3か月以上腎機能へのダメージがある場合にCKDと診断される。しかし、クレアチニンは筋肉中で作られているため、その濃度は筋肉量と運動による影響を受けることがあり、eGFRが50%以下になるまでクレアチニンの濃度上昇が認められないことから、CKDの初期段階における感受性が低いという問題点がある。腎機能の温存のためにも、無症状であるCKD初期段階で治療を開始するために、より早期に腎機能を評価できる新たなバイオマーカーが必要である。以下に、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)を分析機器として用いたCKDバイオマーカーの探索例として、モデル動物を用いたバイオマーカー探索とバイオマーカー候補を用いた疾患予測モデルについて述べる。

2.1 モデル動物を用いたバイオマーカー探索

CKDのモデル動物には、腎臓を6分の5摘出して物理的に腎機能を低下させた5/6腎摘出ラットや、アデニンを添加した飼料を用いてCKDを誘発したアデニン誘発CKDモデルが用いられる²⁾。CKDの初期段階におけるバイオマーカー探索では、アデニンによりCKDが誘発される過程を捉えることでCKD発症に関連する代謝物を見いだすことができる。アデニン誘発CKDラットを用いたバイオマーカー探索方法を以下に示す³⁾。アデニン食摂取後のラットの血液を7日ごとに28日目まで経時的に採取して血漿をLS-MS-IT-TOFで分析した後、溶出時間と検出モード及び m/z を用いて対称群とアデニン摂食群とでOPLS-DAによる解析を行った。なお、質量分析を行うにあたり¹⁵N馬尿酸を内部標準物質として用いた。アデニン食摂取後0日目と7日目の分析結果を用いた解析でバイオマーカー候補として選択されたシグナルは301ピークとなり、アデニン摂食群のみで変動を認めたものは123ピークとなった。マススペクトルや精密質量数、Mass Bank, HMDB, METLIN等のデータベース検索を行い、ピーク形状の確認及び同位体ピークを除くと、未同定2種を含む10種のピークが選択された。次に、0日目とCKDが誘発されている28日目の分析結果を用いた解析では、バイオマーカー候補として未同定4種を含む12種のピークが選択された。未同定ピークを表1に示す。 m/z 310.9262と308.9284の未同定化合物は、溶出時間が同じであり、検出モードがそれぞれポジティブモードとネガティブモードであることから同一化合物であると考えられる。同定できたピークは、トリプトファン、キヌレニン、インドキシル硫酸、 N^6 -スクシニルアデノシン、グリココール酸、リゾフォスファチジルエタノールアミン20:4、硫酸フェニル、 p -クレジル硫酸、フェニルアセチルグリシン、クレアチニンであり、これまでに尿毒症物質として明らかにされている物質も候補として選択さ

表1 OPLS-DA分析より選択された未同定化合物

用いたデータ群	MS	溶出時間/分	モード	変化
0日後と7日後	308.9284	1.917	ネガティブ	増加
	310.9262	1.913	ポジティブ	増加
0日後と28日後	230.9962	6.083	ネガティブ	増加
	254.9807	1.960	ネガティブ	増加
	261.0065	6.225	ネガティブ	増加
	291.1232	11.718	ネガティブ	増加

れている。候補となったピークの面積値の経時変化から、0日後から7日後にかけてピーク面積の増加が認められた化合物は、 N^6 -スクシニルアデノシン、リゾフォスファチジルエタノールアミン20:4、 m/z 310.9262.308.9284の未同定化合物であり、7日後以降はほぼ一定の値で推移した。 m/z 261.0065, 254.9807, 230.9962, 291.1232の未同定化合物は、アデニン食摂取後にピーク面積が増加し始め、28日後まで増加傾向であった。アデニン食摂取後の初期段階においてピーク面積に変動のあった化合物がCKDの初期段階におけるバイオマーカーとして有用であることが示された。なお、尿毒症物質であるインドキシル硫酸、硫酸フェニル、 p -クレジル硫酸、フェニルアセチルグリシンは、腎機能障害の進行とともに濃度が増加する結果となった。さらに、グリココール酸は7日後において瞬間的な増加が認められた。グリココール酸は一次胆汁酸の一つであり、肝臓でコレステロールから生成される。アデニン摂食群において血漿中の総胆汁酸濃度が増加しないことから、CKD状態下で胆汁酸の組成変化が起こることが示唆された。

2.2 バイオマーカー候補を用いた疾患予測モデル

バイオマーカーは、病状や生命体の状態を知る指標であることから、未知検体におけるバイオマーカー検出の有無で疾病を患っているかどうか判断することができる。しかし、その程度を知るためにはさらなる情報が必要となる。そこで、疾患の程度を予測できるモデルの構築が必要となる。ここでは、CKD患者の血漿を用いた検討で導き出されたバイオマーカー⁴⁾を用いて、メタボロミクス手法によるCKDステージ予測モデル構築について概説する⁵⁾。

CKDのバイオマーカー候補として挙げられた m/z をターゲットとしてLC-MSで定量分析し、多変量解析手法により新たな予測モデルの考案を行った。CKD患者の血液サンプルを用いたバイオマーカー候補の探索は、前述のモデル動物を用いた方法と同様に探索されている。CKD予測モデルの構築に用いるバイオマーカー候補を表2に示す。

予測モデルの構築には、血清シスタチンC値から推

表 2 CKD ステージ予測モデルの構築に使用した化合物

化合物	検出モード	精密質量
<i>N</i> - α -アセチル-L-アルギニン	ポジティブ	216.1222
L-キヌレニン	ポジティブ	208.0848
<i>N</i> ⁴ -アセチルシチジン	ポジティブ	285.0961
<i>N</i> ² , <i>N</i> ² -ジメチルグアノシン	ポジティブ	311.1230
フェニルアセチルグルタミン	ポジティブ	264.1110
馬尿酸	ネガティブ	179.0582
インドキシル硫酸	ネガティブ	213.0096
<i>N</i> ⁶ -カルバモイルトレオニルアデノシン	ネガティブ	412.1433
未同定代謝物	ポジティブ	366.1433

定された $eGFR_{cys}$ を用いる。 $eGFR_{cys}$ はシスタチン C (CysC) の値を用いて次式で算出さる。

$$\begin{aligned} \text{男性: } eGFR_{cys} &= (104 \times CysC^{-1.019} \times 0.996^{\text{年齢}}) - 8 \\ \text{女性: } eGFR_{cys} &= (104 \times CysC^{-1.019} \times 0.996^{\text{年齢}} \\ &\quad \times 0.929) - 8 \end{aligned}$$

血清シスタチン C 値は炎症や甲状腺機能不全等の影響を受けることがあるが、筋肉量や食事、運動の影響を受けにくいと、血清クレアチニン値より推定された $eGFR$ では評価が困難な場合に用いられている。

CKD 予測モデルの構築は、以下の手順で行う。まず、検出対象となる各バイオマーカーの検量線を作成し、^{けっしょう} 血清中の各化合物の濃度を求める。未同定化合物にはピーク面積値を用いる。次に $eGFR_{cys}$ との単回帰解析を行う。各ステージの検体をテストセット (TS) とワークセット (WS) に無作為に分類し、TS を用いて $eGFR_{cys}$ に対して OPLS による予測式を作成し、WS を含めた CKD ステージの判定が可能かどうか検討を行う。最後に、TS と WS の組み合わせを変えて複数回検討を行い、予測モデルを構築する。

予測モデル構築に用いた代謝物の血清中の濃度と $1/eGFR$ との関係は、*N*- α -アセチル-L-アルギニン、馬尿酸、インドキシル硫酸の R^2 値がそれぞれ 0.221, 0.226, 0.498 と弱い相関が認められ、L-キヌレニン、*N*⁴-アセチルシチジン、*N*⁶-カルバモイルトレオニルアデノシンおよび未同定化合物は $1/eGFR$ と高い相関を示した。特に *N*⁶-カルバモイルトレオニルアデノシンと未同定化合物は R^2 値が 0.870 と 0.903 と強い相関関係が認められた。構築された予測モデルは次式で表された。

$$\begin{aligned} 1/eGFR_{cys} &= -1.18 \times 10^{-5} (N\text{-}\alpha\text{-アセチル-L-} \\ &\quad \text{アルギニン}) \\ &\quad + 1.90 \times 10^{-5} (\text{L-キヌレニン}) \\ &\quad + 4.51 \times 10^{-5} (N^4\text{-アセチルシチジン}) \\ &\quad - 9.88 \times 10^{-5} (N^2, N^2\text{-ジメチルグアノシン}) \\ &\quad + 2.62 \times 10^{-7} (\text{フェニルアセチルグルタミン}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\quad + 5.83 \times 10^{-7} (\text{馬尿酸}) \\ &\quad - 2.19 \times 10^{-9} (\text{インドキシル硫酸}) \\ &\quad + 1.06 \times 10^{-4} (N^6\text{-カルバモイルトレオニルア} \\ &\quad \quad \text{デノシン}) \\ &\quad + 5.27 \times 10^{-8} (\text{未同定代謝物}) \\ &\quad + 3.36 \times 10^{-3} (\text{女性の場合} \times 2) \\ &\quad - 2.98 \times 10^6 (\text{年齢}) \\ &\quad + 6.75 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

本モデルから算出される $1/eGFR$ と従来法により推定される $1/eGFR$ 値との相関係数は 0.966 となった。このことは OPLS 回帰予測の利用により、ステージ 1~2 の CKD に対しても LC-MS を用いた標的化合物の定量結果から $eGFR$ のより正確な推定が可能であることを意味しており、低ステージも含めた CKD の早期判定に有用であることが示された。さらに、 $1/eGFR$ 値と血清中の代謝物濃度との間に高い相関が認められた代謝物が見いだされ、いずれかの代謝物をターゲットとして CKD ステージを予測することも可能であるが、複数の代謝物を対象として構築した CKD 予測モデルでは、より高い相関係数を示した。以上より単一の代謝物を対象とするより、より正確な CKD ステージの予測が可能となることが示唆される。前述のように $eGFR$ 値は、血清クレアチニン値や血清シスタチン C 値から簡便に推定することができるが、筋肉量や運動、栄養状態等多くの要素を含み、腎機能は過大評価や過小評価される場合がある。本法において $eGFR$ として血清クレアチニン値より推定される値を用いると、43 検体中ステージ 3 以上の検体では差異は認められなかったものの、低ステージにおいて生化学値により決定されるステージよりも高くなる 2 検体や低くなる 2 検体があった。これは、血清クレアチニン値からの推定において腎機能低下を反映しにくいと言われるクレアチニンブラインド領域が存在し、その影響によるものと推察された。以上のように、外的因子を可能な限り除外するためにも、予測モデルの構築において従来法における欠点を考慮した方法を用いることが重要であり、バイオマーカーとして複数の代謝物を対象とすることの優位性が示唆された。

3 おわりに

本稿では、LC-MS による分析結果を用いて、多変量解析による腎疾患関連バイオマーカー探索について概説した。既知の尿毒症物質に加えて、未同定ではあるが新たなバイオマーカー候補が見いだされている。また、質量分析法を用いた新たな CKD ステージ予測モデルは少量の血液検体から簡便な前処理を行った後、比較的短時間で測定結果が得られることに加え、その他の疾患のバイオマーカーが同一の前処理法と測定条件で見いだされれば、技術的には一度の測定で複数の疾患に対する知見

を得ることが可能となる。さらに、ヒトの疾患の発症に関連するバイオマーカー探索が実験動物の結果から応用されることから、獣医療におけるバイオマーカーとしても応用可能であるものと考えられる。以上のように、質量分析法はまだまだ多くの可能性を秘めた技術であり、さらなる研究の発展が期待される。

文 献

- 1) 三井利幸, 奥山修司, 肥田宗政: 分析化学, **53**, 773 (2004).
- 2) T. Yokozawa, H. Y. Chung, H. Oura: *Nephron*, **44**, 230 (1986).
- 3) T. Kobayashi, Y. Matsumura, T. Ozawa, H. Yanai, A. Iwasawa, T. Kamachi, K. Fujiwara, N. Tanaka, M. Kohno: *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 1365 (2014).
- 4) E. Sato, M. Kohno, M. Yamamoto, T. Fujisawa, K. Fujiwara, N. Tanaka: *Eur. J. Clin. Invest.*, **41**, 241 (2011).
- 5) T. Kobayashi, T. Yoshida, T. Fujisawa, Y. Matsumura, T. Ozawa, H. Yanai, A. Iwasawa, T. Kamachi, K. Fujiwara, M. Kohno, N. Tanaka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445**, 412 (2014).



松村有里子 (Yuriko MATSUMURA)
 東京医療保健大学大学院医療保健学研究科
 (〒141-8648 東京都品川区東五反田 4-1-17)。奈良女子大学大学院人間文化研究科
 博士後期課程人間環境科学専攻。博士(理学)。
 <現在の研究テーマ>薬剤耐性菌の迅速検出法の開発・バイオマーカー探索。
 <趣味>社交ダンス。
 E-mail: y-matsumura@thcu.ac.jp

レンタカー特別割引のご案内

ニッポンレンタカー販売㈱とレンタカーの本会会員特別割引を実施しておりますので、ご利用ください。ご不明な点は、ニッポンレンタカーワンデースキップ担当(TEL: 03-6859-6177)まで直接お問い合わせください。

ご予約・詳細は下記アドレスにアクセスしてください。
<https://www.nipponrentacar.co.jp/ods/>
 ID: 7441 PASSWORD: 38145

- (1) お客様情報登録
 ワンデースキップ専用ページよりお客様情報登録(初回のみ)を行います。
 * お客様登録時には運転免許証が必要です。
- (2) レンタカー予約・Web決済
 お客様専用ページにてレンタカーの予約とクレジットカードのお支払いを済ませます。

* 期限までにお支払いがない場合、予約は自動取消しとなります。

- (3) 出発当日営業所へ
 運転免許証をお忘れなくお持ちください。

主なクラス(車種)と割引料金

S-S (フィット, スイフト, デミオ)	6,480円
S-A (カローラ, インプレッサスポーツ)	7,344円
S-W (カローラフィールダー, ウィングロード)	8,316円
S-C (マークX)	10,692円
S-D (クラウン)	16,200円
W-K (シエンタ)	9,720円
W-A (ステップワゴン, ノア)	13,608円

なお、料金等は変更される場合があります。