

特集：プロテオミクス

尿のメタボロミクス —NMR-MP 法による包括的メタボロミクス解析—

根本 直

はじめに

メタボロミクス研究はいわゆるオミクス研究の最後の、そして不可欠な領域として認識されている。対象とする生体分子群は主として低分子性であるため、エネルギー生産機構関連分子などは、ゲノム情報未知であっても種を越えて共通に検出される。そのため、低分子プロフィールの解析は表現型解析の共通情報としての適用範囲が広い。

質量分析はこの分野で主要な分析技術として、クロマトグラフやキャピラリー電気泳動を前置分離手段とした形で発展している^{1~3)}。同時に、感度は質量分析に劣るものの、定量性と試料調製の容易さから核磁気共鳴(NMR)も利用されている(例えば文献 4, 5, 6)。現状ではさまざまな技術が提案されつつあるものの、高い網羅性と定量性を兼ね備えた理想的メタボロミクス解析技術はいまだなく、また、単純に試料を用意すれば解析が終了するというほど自動化もされていない。それゆえ、研究や臨床の現場でその必要性を強く感じていながらも、どのように手をつけてよいか足踏みしてしまうこともあるかと思われる。

一方で試料としての尿は、病態や投薬による生理状態の変化によってその成分が変わることから重要な解析対象であるが、メタボロミクスが化学分析であるという視点からすると、塩濃度が高い、多量の尿素を含む、膀胱内に時間をかけて蓄積された親水性成分の混合物である、などという特徴を持っている。特に高い塩濃度は液体クロマトグラフを前置分離手段として利用する場合や、マトリクス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による直接分析を試みる場合、NMR 装置の検出

器の調整などに影響を及ぼす。

医療現場では注意深く複雑な手順で多数の試料を調製・計測することは現実的ではないので、本稿では、他の技術に比して簡便で、知識発見や意思決定のツールとして応用のできる「最初の一手」に有効な包括的メタボロミクス解析の一手法「NMR-メタボリック・プロファイリング(NMR-MP)法」を解説する。

NMR-MP 法

質量分析を基幹技術としたメタボロミクスが高感度・網羅的であることを目指すとすれば、この手法は、包括的な「ざっくりとした」解析で、標的選定や知識発見、仮説設定の支援を行うものである。質量分析装置が産生するデータ量は膨大で、1 試料は数 10MB から GB 超にまで及ぶ一方、NMR-MP による包括的メタボロミクス解析では、1 データ量はわずか 16kB から 64kB 程度であり、尿試料調製に手間をかけることなく測定は数分で終了する。得た NMR スペクトルは解釈することなく、引き続き統計解析により二次元のデータ分布を得て検討を行う。高度な NMR 解析の知識もその時点までほとんど不要である。

この混合物溶液の NMR スペクトルの統計解析は、Nicholson らのグループによって精力的に進められているが(例えば文献 7)、われわれは、彼らが毒物代謝のメタボローム解析の欧米連合で COMET (The Consortium for Metabonomic Toxicology) プロジェクト^{8,9)}を開始した頃から、知識の発見の過程を重視した日本独自のアプローチ「インタラクティブ解析」を開始し、基盤的・応用的研究を進めてきている。

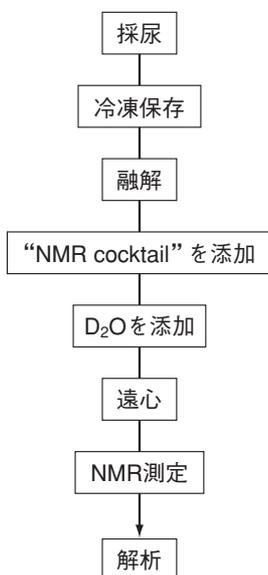


図 1 尿の NMR 試料調製手順

非標的型 (non-target) NMR-MP 法

非標的型 NMR-MP は「何かが起こっているかもしれない」一連の試料が手に入るときに少人数での実施に向いており、データベースは不要である。議論するのは「情報をできるだけ残しながら要約した」単純な二次元のプロット(散布図)であるので、NMR だけでなく関連分野のすべての人が議論に参加できる。

非標的型 NMR-MP のデータの取得のための試料調製手順を図 1 に示す。尿試料(400 μ L)はそのままか必要に応じて一定倍率に希釈し、NMR 測定用のカクテル(緩衝液、内部標準およびナトリウムアジドの混合物)と磁場制御用の重水 5~10%を加えて測定を行う。その際、浮遊物はスペクトルを悪化させるので軽く遠心して取り除く。測定は注意深く調整した装置を用い、質的に揃った一連のスペクトルを取得する。医療系の場合は多数の試料を得ることが難しいことが多いが、その場合は散布図を参考にしながら、スペクトルを専門家とともに 1 つずつ検討すればよい。測定数が増えれば統計的信頼度が上がるので、すべてチェックする必要はなくなる。実際には数十検体を測定して解析することが多い。測定は単純な軽水信号除去一次元スペクトルであるが、後の解析に大きく影響するので、NMR の原信号である FID 信号を観察し、データポイント数、繰り返し時間、水信号除去パルスの強度、積算回数などは注意深く設定しなければならない。

測定に引き続きプロファイリング・ソフトウェア

Alice2 For Metabolome[®] (日本電子)を利用して解析を行う。このソフトウェアは PC で軽快に動き、スペクトルの操作から統計解析までを一体的に行える。すべての FID 信号は半自動処理され、バケット積分(binching)から主成分分析(PCA)まで行われる。バケット積分とは、スペクトルを一定間隔で区切り、その面積を数値化することで、およそ 200 の多変量を得る操作である。尿測定の場合は、多量に存在する水信号、必要に応じて尿素信号をあらかじめ数値化から外すことが多い。このソフトウェアでは試料の追加と削除、スペクトルの表示と拡大縮小、変数の編集と寄与と因子負荷量の表示などが 1 つの画面で操作できる。解析画面の 1 例を図 2 に示す。

NMR 装置は、水素核共鳴周波数で 500 MHz(磁場強度 11.7T)あれば情報は十分に取得できるとされている¹⁰⁾が、横軸分解能と感度は高磁場ほど優れているので、できるだけ高磁場機を利用したいところである。

図 3 は 800 MHz NMR 装置で希釈倍率を変えて計測したものである。1 カ月間-30°Cで保存した尿試料を解凍、図 1 の手順で試料化して再び測定を行うと、再測定データは最初の測定に近い統計空間に位置する(図 3 中の矢印で示す●R)。希釈をしていくと、ある向きにシフトするのが見て取れるが、これは、「希釈倍率が一定であれば、その統計空間でデータの構造を観察できる」という意味を持つ。また、スペクトルの積算によりノイズレベルから信号が浮き出してくるとそれが新たな情報となり、同様な位置シフトが観察される。NMR 装置のダイナミックレンジは 200 万:1 ほどもあるので、積算による S/N 比の向上は重要である。トレードオフとして測定時間の延長を伴うため、現実スループット、試料の劣化時間などを考慮して実施する必要がある。

また、NMR-MP 法は変動値を取り扱っているため、一定の操作によるシステムブランクはデータに一定なバイアスを与えるのみであるから解析に影響しないという特徴がある。例えば、スペクトル上に各試料様に夾雑物信号が出現しても、変動していなければ解析ではキャンセルされ影響は出ない¹¹⁾。このことはプロファイリングの実用性を際立たせる。

以下にわれわれの解析例を紹介する。近交系健常ラットと、それから導出された高血圧自然発症ラットの 10 週齢オスの尿を解析することによって、両系統のデータ群の分離を確認し、採尿ストレスによる体重減少個体が両株とも異常値(アウトライヤ)になること、それらを解析から排除することにより、それぞれの株が分離を維持しつつ概日

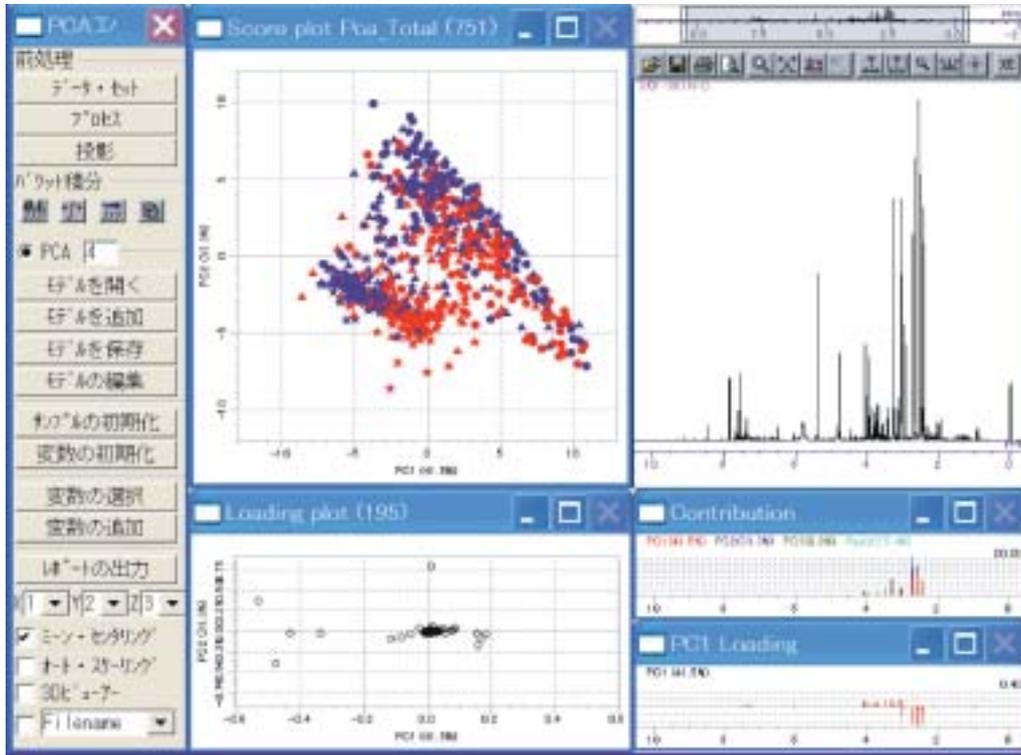


図 2 非標的型 NMR-MP 解析ソフトウェア画面

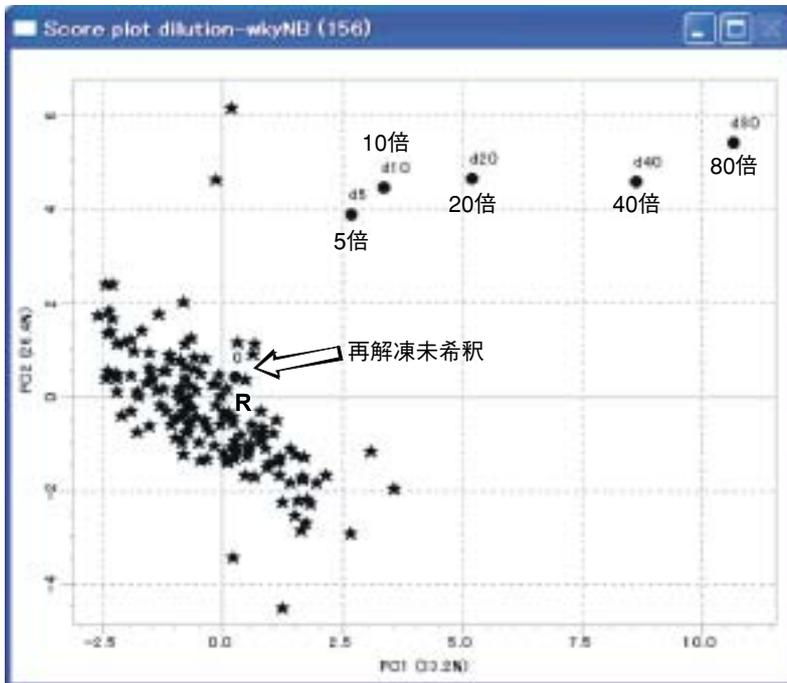


図 3 尿試料の希釈によるデータ分布への影響
(文献 6 より許諾を得て引用)

ズムも捉えられることを示した例¹²⁾, 糖尿病性腎症モデルラットを作製する際に実験開始後 4 週までの毎週採尿に

よって, 糖尿病発症の過程の追跡と, 2-step PCA 法による他の個体とは明らかに異なる個体を検出し, 結果的にその個体が実験終了時まで糖尿病性腎症を発症しない唯一の個体であった例¹³⁾, そして大倍率希釈による体重わずか 2 g のマウス新生仔を標的型 NMR-MP 解析を併用して, その発育過程を追跡した例¹¹⁾などがあるので参考にされたい。実施してみると想定外の現象をあぶり出すことが多い。

実施上の注意点

狭義のメタボミクスが個々の物質の検出・同定・定量を強く指向するのに対し, その変法である非標的型 NMR-MP はデータ分布の構造に意味を見出し, 意思決定支援, 仮説設定をするツールである。したがって, 明示的に結論を示すものではない。また, 主成分分析のデータ散布図であるスコア・プロットで統計主成分 PC 軸(例えば PC1, PC2)にどのくらいの情報が縮約されているかを示す百分率が示してあることが

で統計主成分 PC 軸(例えば PC1, PC2)にどのくらいの情報が縮約されているかを示す百分率が示してあることが

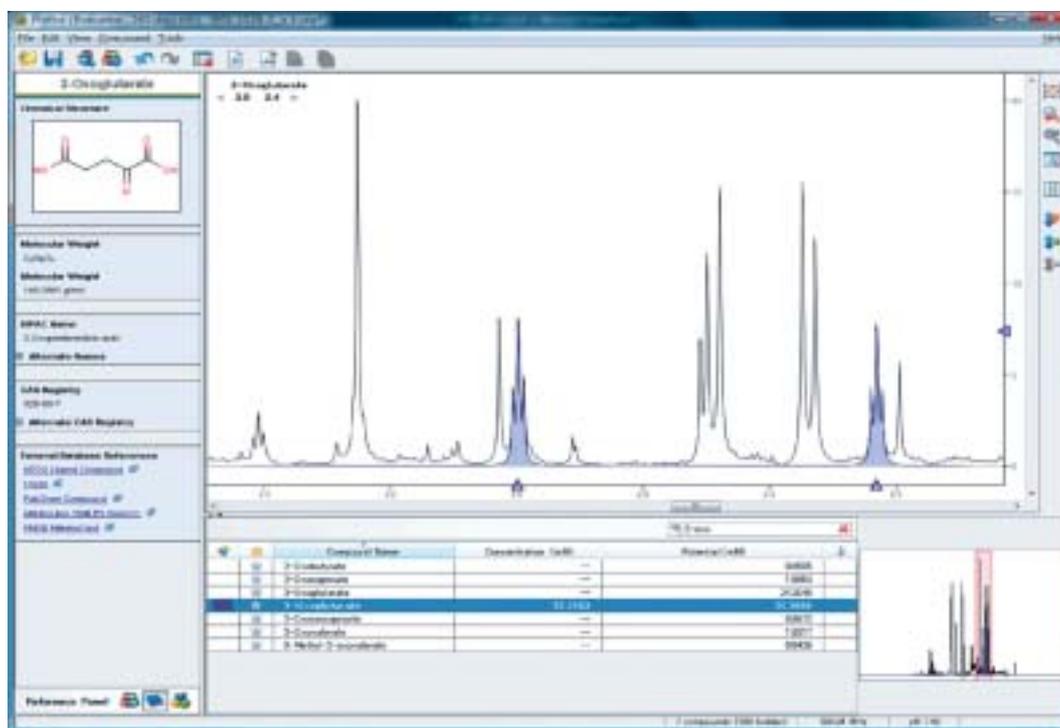


図 4 標的型 NMR-MP 解析ソフトウェア画面

必須である。例えば、PC1 軸が 90% の情報を保持し、PC2 軸が数% の情報しか保持していないのに、矩形に近い散布図で、PC2 軸方向での分布を論じる場合、PC2 軸方向の評価は過大であるが、表示がなければ知ることはできない。

データの分布は原因・結果や誤差の混在したものであり、そのなかに意味のあるデータ分布を判定できるのは人間の認識力である。プロファイリングは「…である可能性がある」「…かもしれない」と示唆してくれるものであり、示された可能性を他のデータで確認する必要がある。

例外として、スペクトル中に病態の判定に利用できる物質の信号が明らかに検出されている場合があり、例えばヒトの新生児代謝異常については常に異常値として検出され、そのスペクトル中に標的物質の信号が明瞭に観測できる¹⁴⁾。

非標的型 NMR-MP 解析の成否は「試料が目的とする変動を含んでいること」と「目的とする変動を覆い隠す変動を取り除くこと」に尽きる。このため、簡易実験のデータ散布図を観察してから、どのような変動を検出したいのかという目的に応じて実験系を最適なものへと変化させていくとよい。基本的なデータ取得と解析の手順は文献⁶⁾を参照されたい。また、食品計測について応用した文献¹⁵⁾もあるので参照されたい。

標的型 NMR-MP 法

データベース非依存の非標的型に対して、強く依存する標的型 NMR-MP も存在する。カナダの Chemomx 社は、異なる磁場強度の装置ごと、0.01 ずつ pH の異なる条件下で、尿中の主な物質 300 種ほどを丹念に測定したデータベースを備えたターゲット・プロファイリング・ソフトウェア Chemomx NMR Suite を販売している(日本ではインフォコム社が販売)。解析画面の 1 例を図 4 に示す。基本的な考え方は、「混合物の NMR スペクトルは純物質のスペクトルを重ね合わせたものである」という前提に立つ。実際の NMR スペクトルは相互作用や測定条件によって単純に単一化合物の信号を多数重畳したものにはならないが、特定物質に目星をつけ定量するには大変便利である。しかしながら、尿スペクトルについて物質を 1 つ 1 つ波形シミュレーションをして合致させる操作を繰り返すため、解析すべき標的スペクトルを選び出す必要があり、非標的型の解析を経てからでないといふ非効率的である。

NMR-MP 解析の応用

実験動物は生理条件を厳密に制御できるが、臨床試料では、目的とする変動を覆い隠すさまざまな変動が現われて

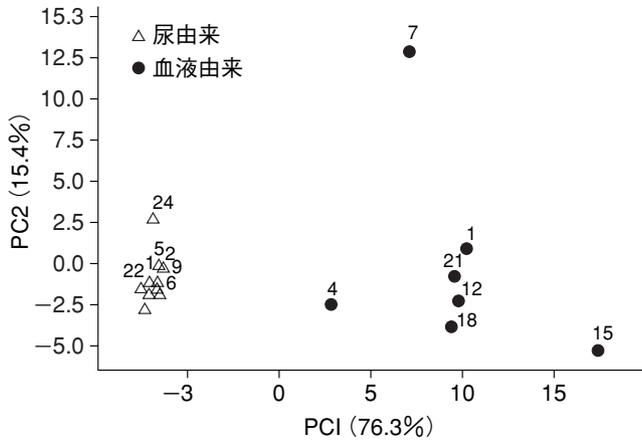


図 5 癌患者 10 例の血液・尿由来試料のデータ散布図

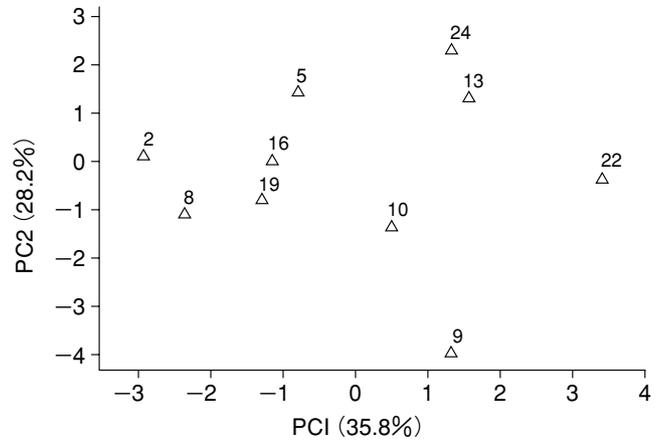


図 6 癌患者 10 例の尿のデータ散布図

くると考えられる。それを克服するためのノウハウの取得には臨床の現場の知識、技術の動員が重要であり、今後の基盤となるパイロット研究の早期実施が強く望まれる。

われわれは東北大学薬学部の藤原らと、人工透析患者の NMR-MP による状態把握¹⁶⁾の研究を開始している。研究の進展により、CKD 患者のステージ判定や QOL の改善に直接寄与することができると考えている。人工透析患者血漿の NMR-MP では、スペクトルのケミカルシフトの決定と定量評価のための内部標準物質として一般的な TSP (sodium 3-(trimethylsilyl)propionate 2, 2, 3, 3-d₄) は、血漿内の高分子成分との相互作用により満足なピーク形状を与えないので、ギ酸信号で定量標準を代替しようという試みをしている¹⁷⁾。

次いで、癌患者 10 例の血液と尿由来試料を同時にデータを散布した例を掲げる(図 5)。左側△が尿由来、右側●が血液由来である。両者を同時に俯瞰すると、全体の構造と大きな変動を観測することができる。図中、7 番は末期癌患者の手術直前の血液由来である。同様に 4, 15 番試料も目立つが、医師によると、それぞれ臨床所見で見事に思い当たる、とのことである。残念ながら同一患者からの尿試料をすべて取得できていないわけではないので、現在検討の途上である。同じ試料群から尿試料のみを利用して散布図を描くと、蝟集したデータ点があたかも拡大したかのようになら別な統計空間が展開し、異なったデータ構造を示す(図 6)。尿試料をさらに多数計測し、データ分布の背後にある生理的なメカニズムの推定しうる情報があぶり出せれば、尿のみで癌の術前術後の病態把握やケアに反映させることができるだろう。

おわりに

包括的メタボロミクス解析の一つ、NMR-MP 法の解説をしてきた。インタラクティブ・プロファイリングは混合物溶液解析のなかでは非常にシンプルでハードルの低い手法であり、一次スクリーニングに直ちに利用できる。基本技術の習得は 3 カ月程度ででき、尿検査の余剰試料を用いて価値ある情報が得られる。NMR 装置は MRI 装置と同一原理で動いているので、保守管理が共通の MRI 施設をはじめ、透析施設、臨床検査ラボなどに 500 MHz 級の NMR 装置が同時に導入されるような日が来ることを願っている。

文 献

1. 富田 勝, 西岡孝明(編). メタボローム研究の最前線. 東京: シュプリンガー・ジャパン, 2003.
2. 丹羽利充(監). 最新・プロテオミクス・メタボロミクス. 東京: 秀潤社(現 学研メディカル秀潤社), 2007.
3. 曾我朋義(企画). メタボローム—代謝研究の新潮流. 東京: 羊土社, 2007.
4. Robertson D, Lindon JC. Metabonomics in toxicity assessment. Informa Healthcare, 2005.
5. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. Elsevier Science, 2007.
6. 根本 直. FT-NMR を用いたメタボリック・プロファイリング. 福崎英一郎(監)メタボロミクスの先端技術と応用. 東京: シーエムシー出版, 2008: 74-85.
7. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat Protoc 2007; 2: 2692-2703.

8. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breaux AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C. Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 ; 187 : 137-146.
9. Lindon JC, Keun HC, Ebbels TM, Pearce JM, Holmes E, Nicholson JK. The consortium for metabonomic toxicology (COMET) : aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 2005 ; 6 : 691-699.
10. Bertram HC, Malmendal A, Petersen BO, Madsen JC, Pedersen H, Nielsen NC, Hoppe C, Mølgaard C, Michaelsen KF, Duus JØ. Effect of magnetic field strength on NMR-based metabonomic human urine data. Comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz. *Anal Chem* 2007 ; 79 : 7110-7115.
11. Shimizu YI, Sunaga E, Aoyagi S, Kanazawa K, Takahashi S, Takahashi Y, Nemoto T. Developmental delineation of metabolic-patterns of neonatal mice by using NMR-metabolic profiling on highly-diluted urine. *J Toxicol Sci* 2009 ; 34 : 343-347.
12. Fujiwara M, Arifuku K, Ando I, Nemoto T. Pattern recognition analysis for classification of hypertensive model rats and diurnal variation using ¹H-NMR spectroscopy of urine. *Anal Sci* 2005 ; 21 : 1259-1262.
13. Nemoto T, Ando I, Kataoka T, Arifuku K, Kanazawa K, Natori Y, Fujiwara M. NMR metabolic profiling combined with two-step principal component analysis for toxin-induced diabetes model rat using urine. *J Toxicol Sci* 2007 ; 32 : 429-435.
14. Fujiwara M, Ando I, Arifuku K, Kataoka T, Kanazawa K, Nemoto T, Kuhara T. Non-targeted NMR Metabolomics : Detection and evaluation for disease status of inborn errors of metabolism using ¹H spectra of human urine. The 45th Annual Meeting of the NMR society of Japan Abstracts, 2006 : 414-415.
15. 根本 直. 新しい食品計測法「NMR-メタボリック・プロファイリング」入門. *ジャパンフードサイエンス* 2009 ; 12 : 22-29.
16. Fujiwara M, Kobayashi T, Jomori T, Maruyama Y, Oka Y, Sekino H, Imai Y, Takeuchi K. Pattern recognition analysis for ¹H NMR spectra of plasma from hemodialysis patients. *Anal Bioanal Chem* 2009 ; 394 : 1655-1660.
17. Ando I, Hirose T, Nemoto T, Totsune K, Imai Y, Takeuchi K, Fujiwara M. Quantification of molecules in ¹H-NMR metabolomics with formate as a concentration standard. *J Toxicol Sci* 2010 ; 35 : 253-256.