



Title	ヒト近位尿管上皮細胞の脂肪滴に関する研究
Author(s)	三浦, 佑介
Citation	北海道大学. 博士(保健科学) 甲第13633号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13633
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91505
Type	theses (doctoral)
File Information	Yusuke_Miura.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

ヒト近位尿細管上皮細胞の脂肪滴に関する研究

三 浦 佑 介

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

2018年度

目次

略語一覧	2
要約	3
第1章 質量分析によるコレステリルエステル定量法の改良	
緒言	6
対象と方法	7
結果	9
考察	13
第2章 ヒト近位尿細管細胞に形成された脂肪滴の分析	
緒言	14
対象と方法	16
結果	20
考察	30
第3章 糖尿病性腎症における尿中コレステリルエステルの分析	
緒言	33
対象と方法	34
結果	35
考察	38
結論	40
謝辞	41
文献	42
業績リスト	50

【略語一覧】

ACR : アルブミン・クレアチニン比

CE : コレステリルエステル

CKD : 慢性腎臓病

CL : カルジオリピン

FA16:0 : パルミチン酸

FA18:1 : オレイン酸

FA18:2 : リノール酸

FA20:4 : アラキドン酸

FA20:5 : エイコサペンタエン酸

FA22:6 : ドコサヘキサエン酸

FC : 遊離コレステロール

LC-MS/MS : 液体クロマトグラフィー/質量分析法

SRM : 選択的反応モニタリング

【要約】

緒言

慢性腎臓病（CKD）は腎機能の低下は不可逆的であり，CKD の進展を抑制するためには早期発見・早期治療が重要である。しかし，既存の診断基準であるアルブミン・クレアチニン比の診断能力には課題がある。CKD に有効な早期診断マーカーは未だ確立されておらず，新たなバイオマーカーが望まれている。本研究では，近位尿細管上皮細胞に形成される脂肪滴の脂質分子の分析を目的とした。そのため，液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）法を用いて，ヒト近位尿細管上皮細胞（HK-2）の脂肪酸添加による脂肪滴形成時のコレステリルエステル（CE）やカルジオリピン（CL）の組成を分析した。さらに糖尿病性腎症の尿検体に応用し，CE が早期診断のバイオマーカーとなり得るか検討した。

対象と方法

化学合成によって入手した標品と内部標準物質を用いて，LC-MS/MS 法による CE の 8 分子種同時定量法を確立した。

HK-2 の各種脂肪酸に対する細胞生存率を求めることで，脂肪滴形成に使用する脂肪酸の濃度を決定した。形成した脂肪滴は Oil Red O 染色し，その染色量から細胞内の脂肪滴量を確認した。次いで，細胞内の脂質を抽出し，LC-MS/MS による CE や CL の分子種の解析を行った。CE と CL の関連性や，Oil Red O 染色量と CE 或いは CL との関連性を検討した。

最後に糖尿病性患者の尿中 CE を測定し，CE が早期バイオマーカーとなり得るか検討した。健常者（N = 58），糖尿病性腎症第 1 期（N = 57）および第 2 期（N = 32）の尿中 CE を分子種ごとに比較した。

結果

Oil Red O 染色により、オレイン酸 (FA18:1)、リノール酸 (FA18:2)、アラキドン酸 (FA20:4)、エイコサペンタエン酸 (FA20:5)、およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) 添加群において脂肪滴形成が確認された。しかし、パルミチン酸 (FA16:0) 添加群では脂肪滴は確認されなかった。同様に不飽和脂肪酸添加群において CE の有意な増加が確認された。一方、CL 分子種はコントロールと比較して差が見られないものや減少傾向を示したものが存在した。CL の過酸化化物である CL-OOH は FA18:1, FA18:2, 20:4 添加群において増加した。CE と CL の総和の間に負の相関傾向が見られた。また、Oil Red 染色量と CE には正の相関、Oil Red O 染色量と CL には負の相関が見られた。

糖尿病性腎症 1 期では健常者と比較して、CE18:2, CE18:3, CE20:4, CE20:5 において有意な増加が見られ、CE18:1 では有意な減少が見られた。総 CE はコントロールと 1 期で差は見られなかったが、2 期では有意に増加した。コントロール群と糖尿病性腎症第 1 期群の鑑別において、CE20:5 は ROC 解析で曲線下面積 (AUC) が 0.74 ($P < 0.001$) であり、ACR の AUC 値である 0.68 ($P < 0.001$) よりも良好であった

考察

HK-2 細胞に各種脂肪酸 100 μ M を 24 時間負荷することで脂肪滴が形成されたが、FA16:0 を負荷した場合のみ脂肪滴は認められなかった。FA16:0 添加による脂肪滴形成は濃度および時間依存的に増加することが報告されており、より高濃度、あるいはより長時間の条件下で実験を行った場合に脂肪滴が形成される可能性があると考えられた。

各種脂肪酸を HK-2 細胞に添加した際に総 CE は増加した。Acyl-coenzyme A: cholesterolacyltransferase (ACAT) は細胞内における CE の生成を担い、ACAT1, ACAT2 と 2 種のアイソザイムが存在する。このうち ACAT1 は全身の組織や細胞に発現しておりコレステロールの恒常性に関与することが報告されている。そのため、脂肪酸を HK-2 細胞に添加することで ACAT1 の発現量が増加し、エステル化が亢進したことが予想され得

る。また、CE と Oil Red O 染色量との間に正相関が認められたことは、脂肪滴として CE が細胞内に蓄積したことを示唆する。

CE と CL 間に負の相関傾向が見られ、Oil Red O 染色量の増加と CL は負の相関傾向が見られた。CL はミトコンドリア機能や構造を維持するうえで欠かせない脂質であるため、CL の減少や酸化はミトコンドリア機能の低下につながると考えられる。

尿中で CE が増加する機序として、近位尿細管上皮細胞に形成される脂肪滴が関与している可能性が考えられる。近位尿細管上皮細胞に遊離脂肪酸が取り込まれると、細胞内に CE を含む脂肪滴が形成される。脂肪滴の形成にミトコンドリア機能低下が重なることで細胞が障害され、尿中に脱落し、CE の増加として反映されると推察する。

コントロール群と糖尿病性腎症第 1 期の尿中 CE の比較から、尿中 Total CE には差がない一方で、CE18:2, 20:4, 20:5 が有意に増加し、CE18:1 が有意に減少することが明らかとなった。よって、極早期の糖尿病性腎症の診断のために、これらの CE 分子種を質量分析により定量することが有用であると考えられる。

腎疾患における近位尿細管上皮細胞障害と脂質に関するメカニズムは依然として解明されていない。本研究では脂肪滴形成時の CE および CL の変動が明らかとなった。今後、脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子との関連性を検討し、尿中に脂質が出現する機序を明らかにしていく。さらに臨床データとの関連性から、尿中 CE が腎疾患の評価や早期診断に有用な測定法となることが期待される。

結論

脂肪酸の添加により HK-2 細胞に脂肪滴を形成させ、その脂質分子種の変動を解析することができた。CE および CL の変動と HK-2 細胞への障害の関連性を明らかにすることで尿細管障害における病態解明の足がかりとなる可能性がある。また、早期糖尿病性腎症患者の尿において質量分析による CE 分子種の定量が効果的であることが示された。尿中 CE20:5 は早期糖尿病性腎症の鑑別に有用となる可能性がある。

第1章 質量分析によるコレステリルエステル定量法の改良

【緒言】

遊離コレステロール (FC) は細胞膜の構成要素の一つであり、スフィンゴ脂質と共に脂質ラフトを形成し、タンパク質を集積することでシグナル伝達や細胞内輸送に関与するとされている [1]。FCは血中でレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) の作用を受けてコレステリルエステル (CE) となる [2]。CE はコレステロールの貯蔵・輸送型であり、血中のコレステロールの 70-80%はエステル型として存在している。臨床的な意義として、血中 CE は LCAT 欠損症や重度の肝障害で低下することが知られている [2,3]。しかし、臨床検査において CE は総コレステロールと FC の値から算出されており、直接測定されていない。また、CE は FC に脂肪酸が一つ結合したものであり、CE は日常的な脂肪酸の摂取を安定的に反映すると報告されている [4]。しかし、CE の分子種情報を得るためには酵素法による測定では限界があり、質量分析による定量が必要となる。CE 分子種ごとの性質の違いを示す例として、HDL 中の CE を VLDL や LDL に転送するコレステリルエステル転送蛋白の転送率が CE 分子種間で異なるという報告がある [5]。したがって、CE を分子種別に定量することは、脂質代謝や病態を理解するうえで重要である。

我々は以前、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) による分子種別 CE の定量法の確立を報告した [6]。7 種類の CE 分子種を同時に定量可能となったが、天然に存在する多くの分子種の一部にすぎないという課題も残った。n-3 系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (FA20:5) は血中におよそ 1-2% 存在しており [7]、抗炎症作用や心血管保護作用が知られている [8,9]。これまでに FA20:5 のエステル体である CE20:5 の分析例は少ないものの、冠動脈疾患で減少するという報告もある [10]。そのため、CE20:5 の定量分析は今後の脂質代謝や病態の解明に必要であると考えられる。

そこで、本研究では CE20:5 を新たに定量系に加え、8 種類の CE 分子種を同時に定量するために質量分析法の改良を行った。定量系の構築に必要な CE20:5 とその内部標準物質 (IS) である $^2\text{H}_3$ -20:5 は、以前の報告に従い化学合成により入手した [11]。

【対象と方法】

1. 材料と分析機器

コレステロール, 脱水ジクロロメタン, 酢酸アンモニウム, LC/MS 用ヘキサン, クロロホルム, イソプロパノール, メタノール, 超純水は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。他の試薬類は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) より入手した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck pre-coated plates (20 cm×20 cm; layer thickness:0.25 mm; Silica Gel 60F254) を使用した。カラムクロマトグラフィーには silica gel N60 (spherical type particle size:40–50 μm; 関東化学) を使用した。¹H NMR と ¹³C NMR のスペクトルは JNM-ECP400 (JEOL, Japan; ¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz) より取得した。¹H NMR と ¹³C NMR の解析には ACD/NMR processor software (Advanced Chemistry Development, Inc.) を用いた。合成した標準品の低分解能マススペクトルは LXQ (Thermo Fisher Scientific) から取得した。

2. LC-MS/MS による CE 定量法

既法を元にして, LC-MS/MS 法によるコレステロールパルミチン酸エステル (CE16:0), ステアリン酸エステル (CE18:0), オレイン酸エステル (CE18:1), リノール酸エステル (CE18:2), リノレン酸エステル (CE18:3), アラキドン酸エステル (CE20:4), FA20:5 エステル (CE20:5), FA22:6 エステル (CE22:6) の 8 分子種同時定量法を確立した [6]。LC-MS/MS による定量には TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) と Thermo Finnigan Surveyor HPLC System (Thermo Fisher) を使用した。HPLC カラムには Accucore C18 (2.6 μm, 50 × 2.1 mm i.d., Thermo Fisher) を使用し, カラムオーブンは 40°C に設定した。HPLC は 5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (メタノール/水 = 1/1) を 35%, イソプロパノールを 65% 用い, 0.2 mL/min でアイソクラティック溶出した。イオン化は大気圧化学イオン化法で行い, 陽イオンモードにおいて選択的反応モニタリング (SRM) 法で検出した。ピーク面積の計算, 検量線の作成及びサンプルの濃度算出には, Xcalibur2.0.7 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

3. 分析法のバリデーション

血清 20 μL に、エタノールに溶解された 12 $\mu\text{mol/L}$ の IS 溶液を 200 μL 、ヘキサンを 1200 μL 、脱イオン水を 1000 μL 加え攪拌した。次いで、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上層を回収した。濃縮乾固後、イソプロパノール 300 μL に再溶解し、さらに 8 倍希釈したものを添加回収試験用のサンプルとして分析した (added 0 $\mu\text{mol/L}$)。同様に、血清に最終濃度が 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、6.0 $\mu\text{mol/L}$ となるように CE20:5 溶液を添加して添加回収試験を行った (N = 6)。

【結果】

1. CE20:5 の合成

コレステロール 29.8 mg (77 μmol) を 50 mL ナス型フラスコに取り、5 mL の脱水ジクロロメタンに溶解した。次いで EDC-HCl 44.3 mg (154 μmol) と DMAP 13.9 mg (115 μmol) を加え、フラスコ内を窒素置換した。FA20:5 46.6 mg (231 μmol) をシリンジでフラスコに入れ、室温で 5 時間反応させた。TLC (ヘキサン/酢酸エチル= 30) を用いて反応を確認したところ、Rf 値 = 0.3 の位置にスポットが確認された (発色試薬: リンモリブデン酸)。溶媒を減圧留去後、酢酸エチルを加え、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次分液洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を除去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル= 30) により精製した。収率は 100% であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.31-5.43 (10 H), 4.60-4.64 (1 H), 2.81-2.86 (8 H), 2.28-2.33 (4 H), 1.09-2.14 (37 H), 1.02 (3 H), 0.98 (3 H), 0.87-0.88 (6 H), 0.68 (3 H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 172.99, 139.65, 132.01, 128.55, 128.23, 128.10, 127.86, 127.00, 122.60, 60.21, 56.67, 56.11, 50.00, 42.29, 39.50, 36.98, 36.57, 35.78, 33.70, 31.84, 28.00, 26.55, 25.61, 25.52, 24.87, 22.81, 22.55, 20.54, 14.27, 11.83; APCI-MS: m/z 688.3 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

2. CE20:5 の合成

$^2\text{H}_3$ -コレステロール 20.2 mg (52 μmol) を 50 mL ナス型フラスコに取り、5 mL の脱水ジクロロメタンに溶解した。次いで EDC-HCl 29.8 mg (155 μmol) と DMAP 9.4 mg (78 μmol) を加え、フラスコ内を窒素置換した。FA20:5 31.3 mg (103 μmol) をシリンジでフラスコに入れ、室温で 4 時間 30 分反応させた。上記と同様の後処理を行い精製した。収率は 95% であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.28-5.42 (10 H), 2.81-2.86 (8 H), 2.29-2.33 (4 H), 1.10-2.14 (35 H), 1.01 (3 H), 0.98(3 H), 0.85-0.87 (6 H), 0.68 (3 H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400

MHz): δ 173.01, 139.57, 132.02, 128.55, 128.23, 128.10, 127.87, 127.00, 60.21, 56.67, 56.11, 53.40, 50.00, 42.28, 39.71, 39.49, 36.52, 39.16, 35.78, 34.04, 31.75, 28.00, 26.55, 25.60, 25.52, 24.87, 23.80, 22.80, 22.54, 20.54, 19.28, 18.69, 14.26, 11.83; APCI-MS: m/z 691.4 $[M+NH_4]^+$.

3. 合成した標準品の確認

合成した CE20:5 と 2H_3 -CE20:5 をメタノール（10% 酢酸アンモニウム水溶液を含む）に溶解して質量分析装置で確認したところ、CE20:5 のアンモニウムイオン付加体が m/z 688.3 に検出された（Fig. 1A）。同様に、 2H_3 -CE20:5 のアンモニウムイオン付加体が m/z 691.4 に検出された（Fig. 1B）。

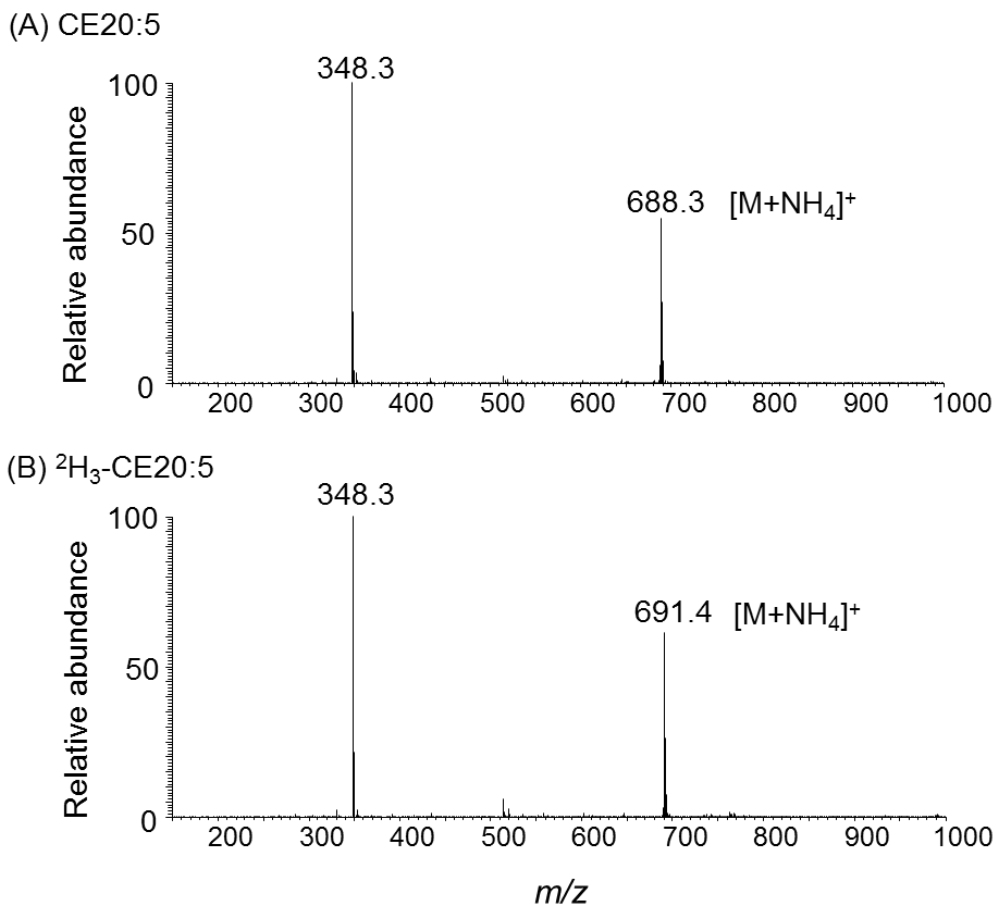


Fig. 1. 合成品の低分解能マススペクトル。

4. SRM クロマトグラム

CE16:0, CE18:0, CE18:1, CE18:2, CE18:3, CE20:4, CE20:5 および CE22:6 の 8 分子種について、 $[M+NH_4]^+$ をプリカーサーイオンに選択し、 m/z 369.3 をプロダクトイオンに選択して SRM クロマトグラムを描出した (Fig. 2)。同様に CE 分子種の IS について、プリカーサーイオンを $[M+NH_4]^+$ 、プロダクトイオンを m/z 372.4 として SRM クロマトグラムを描出した。標品と IS がほぼ同じ溶出時間で検出され、単一のピークを示した。

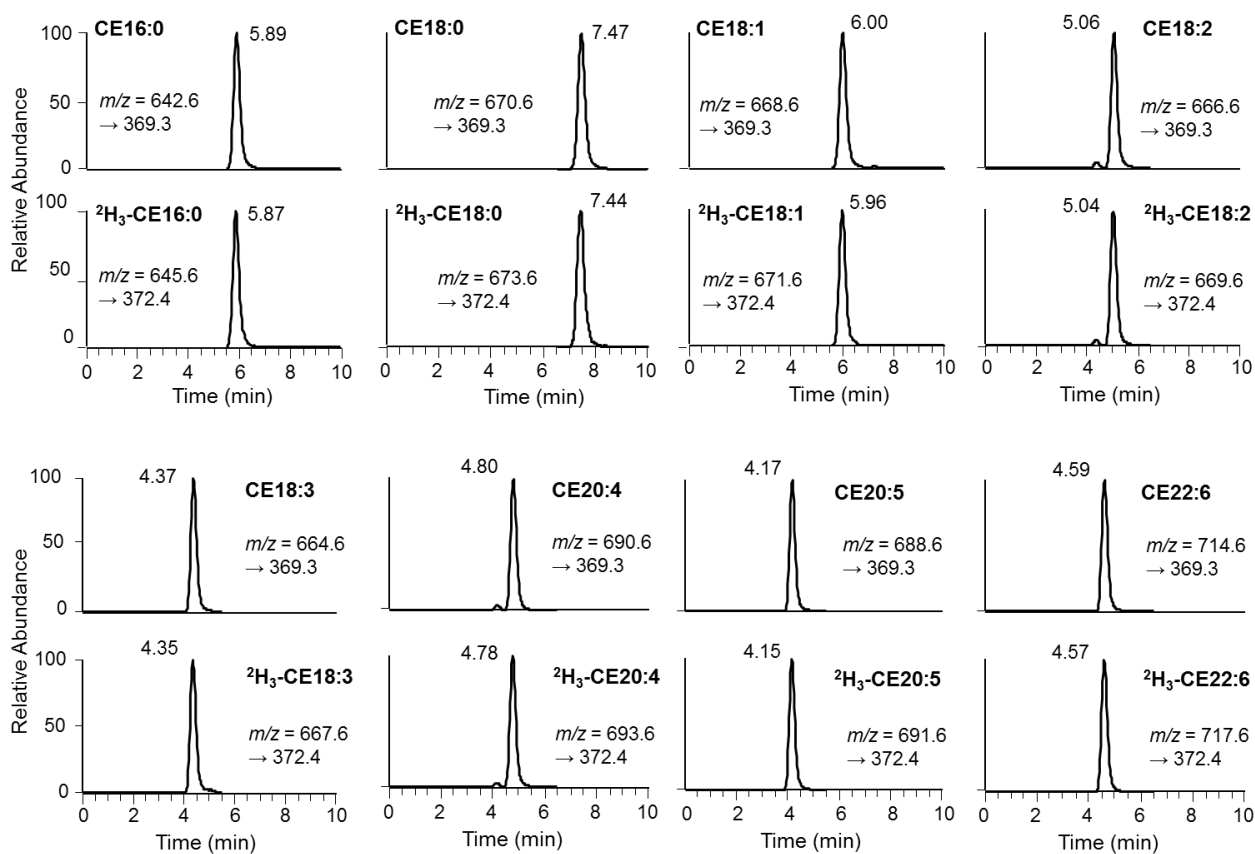


Fig. 2. 標品と IS の SRM クロマトグラム。

5. CE20:5 のバリデーション

合成した標品 CE20:5 について検量線を描いたところ、 $R = 0.999$ という良好な直線性が確認できた (Fig. 3)。添加回収試験の結果は、CV 4.4% 以内と良好な再現性が得られた。また真度 97.3–101.2%、回収率 92.1–104.7%という良好な結果が得られた (Table 1)。

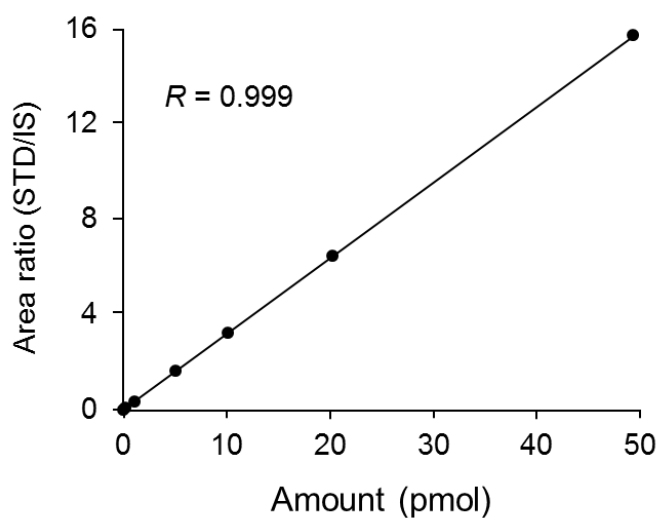


Fig. 3. CE20:5 の検量線。0.05, 0.2, 0.5, 5, 5, 10, 20, 50 pmol の計 8 点から成る。

Table 1. CE20:5の添加回収試験 (N = 6)

Added ($\mu\text{mol/L}$)	Mean \pm SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Accuracy (%)	Recovery range (%)
0.00	0.099 \pm 0.004	4.4	-	-
2.00	2.223 \pm 0.052	2.4	101.2	97.9-104.7
6.00	6.031 \pm 0.145	2.4	97.3	92.1-99.1

【考察】

SRM 法により選択性の高い定量分析を行う場合、質量の近い CE 分子種が HPLC で十分に分離される必要がある。天然に ^{13}C はおよそ 1% 存在するため、炭素数が多い化合物ほど質量が 1 または 2 大きい同位体のピークが出現する [12]。例えば、CE18:1 と CE18:2 の質量の違いは約 2 であるため、CE18:2 の同位体ピークが CE18:1 と重なることが想定される。実際に CE の分析で同位体ピークが検出されることが報告されている [13]。そのため、CE18:0, CE18:1, CE18:2, CE18:3 の間や CE20:4 と CE20:5 の間でピークが分離するように HPLC の移動相の条件を定めた (Fig. 2)。

LC-MS/MS による生体試料の定量分析では、イオンサプレッションによる影響を抑制するため信頼性の高い IS が不可欠である [14]。分析対象と抽出、分離及びイオン化の過程において同様にふるまう安定同位元素標識体が IS として最も適している [14,15]。そのため、CE 分子種それぞれに対し重水素標識体を化学合成することは、生体試料へ応用するうえで優れた手法であると考えられる。その一方で、重水素標識体の性質が必ずしも分析対象と一致しないという例も報告されている [14,15]。本実験では、標品と IS の保持時間がほぼ一致しており (Fig. 2)、検量線や添加回収試験の結果も良好であった (Fig. 3, Table 1)。したがって、我々が確立した定量法は多くの夾雑物を含む生体試料の定量に十分な性能であると考えられた。

第2章 ヒト近位尿細管細胞に形成された脂肪滴の分析

【緒言】

慢性腎臓病（CKD）は腎臓の障害や腎機能の低下が3ヶ月以上続く状態と定義されており、糸球体濾過量（GFR）と蛋白尿或いはアルブミン尿によって分類される [16]。CKDが進行すると、心血管疾患や末期腎不全など深刻な健康問題につながる [17-19]。近年、CKDは世界的に増加しており、2030年には腎代替療法（RRT）が必要な患者数が現在の約2倍に達すると予測されるなど [20]、関心が高まっている。RRTは患者のQOLを損なうばかりでなく、高額な治療費が国の医療費の圧迫や貧困層が治療を受けられないといった問題を抱えている。一般的に腎機能の低下は不可逆的であり、CKDの進展を抑制するためには早期発見・早期治療が重要である。しかし、既存の診断基準であるアルブミン尿が検出される前に腎の病的変化や腎機能の低下が報告されるなど、その診断能力には課題がある [21]。CKDに有効な早期診断マーカーは未だ確立されておらず、新たなバイオマーカーが望まれている。

CKDのバイオマーカーは大きく分類すると、糸球体障害を反映するものと近位尿細管上皮細胞の障害を反映するものが存在する [19,21,22]。近位尿細管上皮細胞は水、電解質、アルブミンなどのタンパク質の再吸収を行い、恒常性の維持に対し重要な役割を果たしている。近位尿細管上皮細胞に過剰なストレスが与えられることにより、炎症、線維化やreactive oxygen species（ROS）の発生が起これ、アポトーシスを引き起こすことが知られている [23,24]。近年、糖尿病性腎症患者で近位尿細管上皮細胞への脂肪滴の蓄積や脂質代謝関連遺伝子の異常が確認された [25]。脂肪滴の蓄積はその脂質毒性からアポトーシスを引き起こすとされ [26]、脂肪酸を細胞内へ取り込むことが要因の一つとなっている。ヒトの近位尿細管上皮細胞モデルとしてHK-2細胞が多くの研究に用いられている。これまでに脂肪酸をHK-2細胞に添加することで、脂肪滴の生成や、炎症、線維化、ROSの発生、アポトーシスなどに関与することが報告されている [27-32]。しかしその一方で、脂肪滴中の脂質分子について分子種レベルでの詳細な解析は行われていない。脂肪滴の組成

を理解することは、糖尿病、肥満、および脂質異常症などの病態を解明する上で重要である。さらに、病態に特異的な脂質分子が発見できれば、治療の標的にもなり得る。

我々はこれまでに、腎疾患の尿中脂質の分析において、トリグリセリド分布が腎疾患群と非腎疾患群で重なる一方（未発表データ）、コレステリルエステル（CE）は腎疾患患者に特異的に検出されることを見出した [33]。このことは、尿中 CE の腎疾患における病態生理学的な意義が大きい可能性を示している。また、近位尿細管上皮細胞は主に遊離脂肪酸のβ酸化によってエネルギーを獲得しており [34]、ミトコンドリア機能が維持されることは重要である。カルジオリピン（CL）はミトコンドリア固有に存在するリン脂質であり、脂肪酸を4つ有するという独特の構造を取っている（Fig. 4）。CLの過酸化や減少が生じることで、ミトコンドリア機能が低下することが知られている [35,36]。したがって、脂肪滴形成時の CL 動態は病態を解明するうえで重要な手掛かりとなる可能性がある。

本研究では、脂肪酸を取り込むことにより、近位尿細管上皮細胞に形成される脂肪滴の詳細な脂質解析を行うことで、細胞脂質代謝の解明に寄与することを目的とした。そのために、HK-2細胞に種々の脂肪酸を負荷することで脂肪滴の形成を行い、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）法により CE および CL の分析を行った。

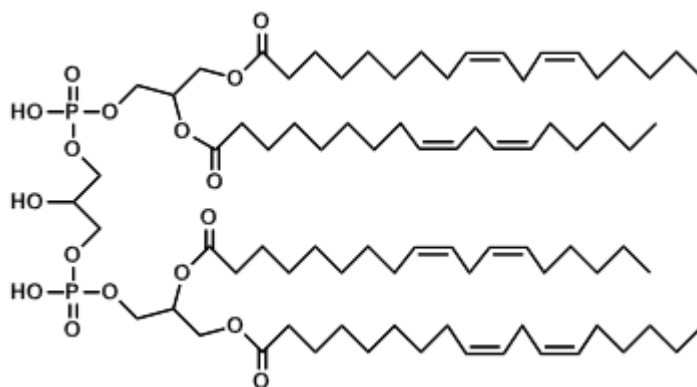


Fig. 4. カルジオリピンの構造式

【対象と方法】

1. 材料

酢酸アンモニウム, LC/MS 用ヘキサン, クロロホルム, イソプロパノール, メタノール, 超純水は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)から購入した。他の試薬類は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan)より入手した。コレステリルエステル及びその重水素標識体は我々の以前の報告に従い化学合成した [11]。

2. 細胞培養

ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (HK-2) は DMEM (10% FBS, 0.225% 炭酸水素ナトリウム, 1% Penicillin–Streptomycin を含む) を用いて, 37 °C の CO₂ インキュベーター (5% CO₂) で継代培養された。

3. 細胞毒性試験

パルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), ドコサヘキサエン酸 (FA22:6) の HK-2 細胞に対する毒性を確認した。HK-2 細胞を 96 穴プレートに 2.0×10^4 cells/well となるように播種し, 24 時間培養した。エタノールに溶解された各種脂肪酸を終濃度が 0, 100, 200, 300, 400 μ M となるように添加した。21 時間培養後に WST-1 試薬 (株式会社同人科学研究所) を 100 μ l/well ずつ添加し, さらに 3 時間培養後, マイクロプレートリーダー (PerkinElmer ARVO MX 1420 MULTILABEL COUNTER) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール (0 μ M) に対する吸光度の値から計算した。

4. Oil Red O 染色

Oil Red O 染色は中性脂質との親和性が高く, 細胞内の脂肪滴の検出に適した染色法である。脂肪酸添加により HK-2 細胞内に生成した脂質を検出するために, Oil Red O 染色により既法を参考として中性脂質を染色した [33]。HK-2 細胞を 24 穴プレートに 5.0×10^4

cells/well となるように播種した。24 時間培養後に, FA16:0, FA18:1, LFA20:4A, FA20:5, FA22:6 の各脂肪酸はエタノールに溶解し, 終濃度が 100 μM となるように添加した。24 時間培養後, 培養液を除去し PBS で 2 回洗浄した。次いで 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を 200 $\mu\text{l/well}$ ずつ添加し, 室温で 30 分間インキュベーションし細胞を固定した。PBS で 1 回洗浄後, 60% イソプロパノールを 200 $\mu\text{l/well}$ ずつ添加し, 5 分間静置した。Oil Red O 溶液 (0.5% Oil Red O イソプロパノール溶液/蒸留水= 3/2) を 200 $\mu\text{l/well}$ ずつ用いて室温で 20 分間染色し, PBS で 3 回洗浄後, 脂肪滴を位相差顕微鏡 (Olympus IX71) で観察した。引き続き, 染色している色素を抽出し, 相対的な吸光度を測定することで定量的に検討した。100% イソプロパノールを 200 $\mu\text{l/well}$ ずつ添加し, 5 分間静置した。呈色したイソプロパノールを 100 μL ずつ 96 穴プレートに取り, イソプロパノールをブランクとして, マイクロプレートリーダーで吸光度 (500 nm) を測定した。染色量は, 対照群の吸光度に対する脂肪酸添加群の吸光度を相対的に示した。

5. BCA 法によるタンパク質定量

HK-2 細胞を 6 穴プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように播種した。24 時間培養後に, FA16:0, FA18:1, LFA20:4A, FA20:5, FA22:6 の各脂肪酸はエタノールに溶解し, 終濃度が 100 μM となるように添加した培地と交換した。24 時間培養後, 培養液を除去し PBS で 2 回洗浄した。RIFA16:0 buffer を 150 $\mu\text{L/well}$ 添加し, セルスクレーパーを用いて細胞を剥離・回収する操作を 2 回行った。氷上で 30 分インキュベート後, 4°C, 15,000 rpm で 25 分間遠心分離した。上層 5 μL を 96 穴プレートに入れ, タンパク質定量に用いた。(Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) 標準液には 2 mg/mL bovine serum albumin (BSA) を用い, 2-0.03125 mg/mL の希釈系列を調製した。Working Solution を各ウェルに 300 μL ずつ添加して室温で 15 分間インキュベートした後, マイクロプレートリーダーで吸光度 (560 nm) を測定した。BSA の濃度と吸光度から検量線を作成し, サンプルのタンパク質濃度を算出した。タンパク質濃度を測定後, すみやかに脂質の抽出を行った。

6. LC-MS/MS による CE の定量

タンパク質定量後の細胞抽出液に内部標準液（0.5 $\mu\text{mol/L}$ $^2\text{H}_3\text{-CE16:0}$, $^2\text{H}_3\text{-CE18:1}$, $^2\text{H}_3\text{-CE18:2}$, $^2\text{H}_3\text{-CE20:4}$, $^2\text{H}_3\text{-CE20:5}$, $^2\text{H}_3\text{-CE22:6}$ を含むエタノール溶液）を 150 μL 加えた。ヘキサン 300 μL を加え、よく攪拌後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上層を回収した。上層を濃縮乾固した後、イソプロパノール 75 μL に再溶解させて LC-MS/MS 用のサンプルとした。そのうちの 10 μL 注入し、LC-MS/MS を用いて定量測定を行った。

7. LC-MS/MS による遊離コレステロールの定量

タンパク質定量後の細胞抽出液に内部標準液（12 mmol/L $^2\text{H}_3\text{-CE16:0}$, $^2\text{H}_3\text{-CE18:1}$, $^2\text{H}_3\text{-CE18:2}$, $^2\text{H}_3\text{-CE20:4}$, $^2\text{H}_3\text{-CE20:5}$, $^2\text{H}_3\text{-CE22:6}$ を含むエタノール溶液）を 200 μL 加えた。ヘキサン 300 μL を加え、よく攪拌後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上層を回収した。上層を濃縮乾固した後、イソプロパノール 75 μL に再溶解させて LC-MS/MS 用のサンプルとした。

8. Orbitrap LC/MS によるカルジオリピンの分析

カルジオリピン (CL) およびその過酸化物質 (CL-OOH) の分析は以前に報告した方法に従って行った [37]。高分解能質量分析装置である Orbitrap を用いて半定量的に CL および CL-OOH を分析した。タンパク質定量後の細胞抽出液にクロロホルム/メタノール溶液 (1:2, v/v) を 400 μL 加え攪拌した。さらにクロロホルム 200 μL , 脱イオン水を 60 μL 加え攪拌後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。下層を回収して濃縮乾固した後、イソプロパノール 75 μL に再溶解させて LC-MS/MS 用のサンプルとした。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法で行い、陰イオンモードにおいて検出した。

9. 統計解析

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で表し、統計ソフトには EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意

水準とした。図中で、*は 5%、**は 1%、***は 0.1%の危険率を示した。平均値の比較には One-way ANOVA 検定の後、Dunnett 法による多重比較検定を行った。相関係数の算出にはピアソンの相関係数を用いた。

【結果】

1. 細胞毒性試験

FA16:0 添加群における細胞生存率は 87.8%-96.9%, FA18:1 添加群における細胞生存率は 99.4%-105.3%と HK-2 細胞への毒性は確認されなかった (Fig. 5)。FA18:2 添加群では 300 μM から統計的に有意に細胞生存数の減少を認めた。FA20:4 添加群, FA20:5 添加群, および FA22:6 添加群では 100 μM で細胞生存率が有意に上昇し, 200 μM 以上では濃度依存的に細胞への毒性を示した。

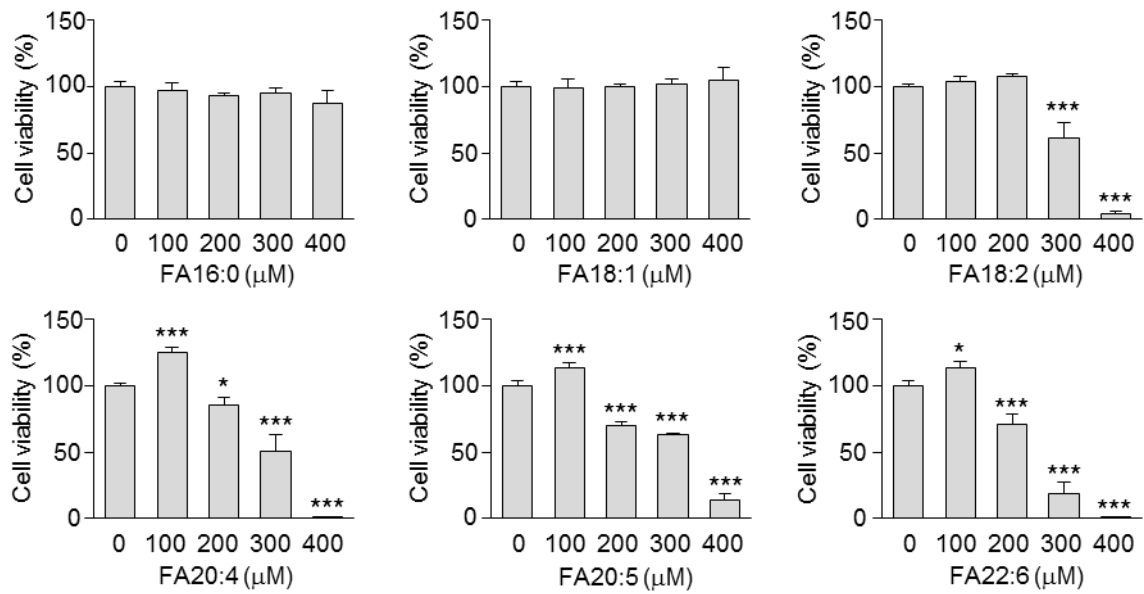
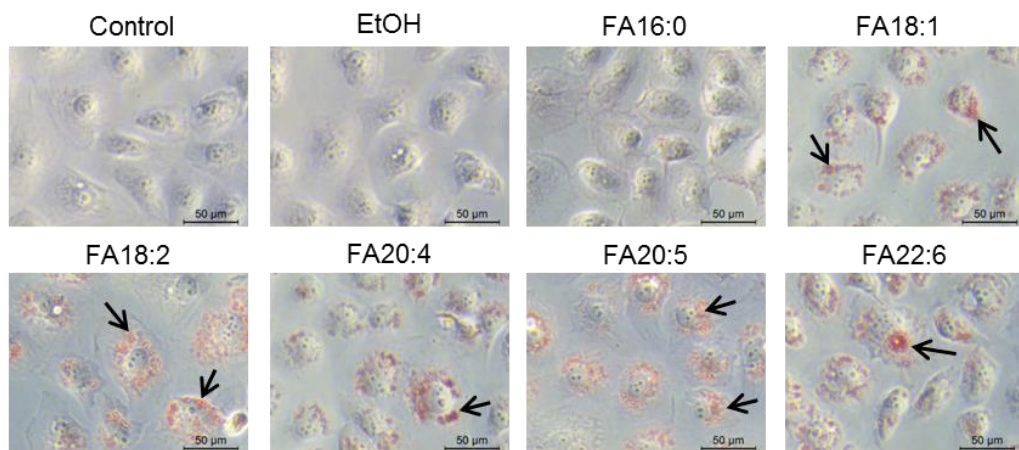


Fig. 5. HK-2 細胞に対するパルミチン酸, オレイン酸, リノール酸, アラキドン酸, エイコサペンタエン酸, およびドコサヘキサエン酸の細胞毒性試験。各濃度の脂肪酸を添加してから 24 時間後の細胞生存率をコントロールに対する百分率で示した。 * $P < 0.05$ vs control, $N = 5$ 。

2. Oil Red O 染色

FA18:1, FA18:2, FA20:4, FA20:5, および FA22:6 添加群では脂肪滴の形成が確認された (Fig. 6A)。一方, エタノール添加群と FA16:0 添加群では脂肪滴の形成は見られなかった。同様に Oil Red O 染色量は不飽和脂肪酸添加群において有意に増加した (Fig. 6B)。

(A)



(B)

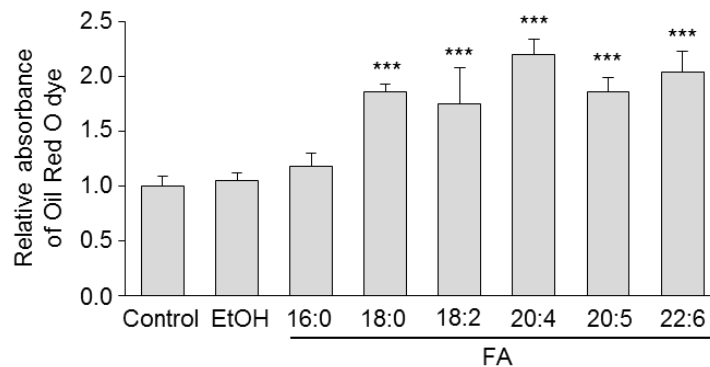
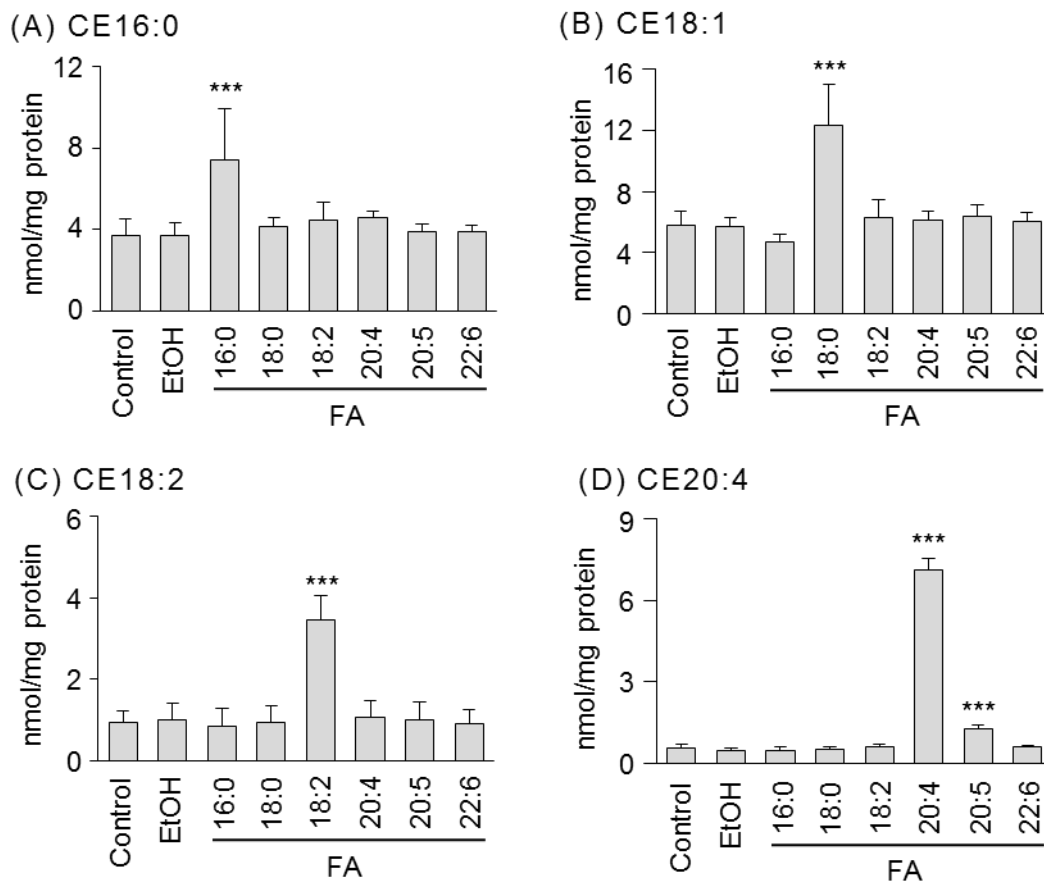


Fig. 6. (A) Oil red O 染色による HK-2 細胞に形成された脂肪滴の検出。細胞にエタノール (EtOH), パルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。(B) Oil Red O 染色量の相対比較。イソプロパノールで溶出した Oil Red O 色素をコントロールに対する相対吸光度 (500 nm) で表した。*** $P < 0.001$ vs control, N = 6。

3. CE と FC の定量

各脂肪酸添加群における CE 分子種ごとの変化を Fig. 7 に示した。添加した脂肪酸を有する CE 分子種が有意に増加した一方で、それ以外の CE 分子種に変化は見られなかった。不飽和度の高い脂肪酸を添加した場合に、不飽和度の低い脂肪酸を添加したときよりも CE が増加していた。次に、各 CE 分子種の総和を脂肪酸添加群ごとに比較したところ、FA18:1, FA18:2, FA20:4, FA20:5, および FA22:6 添加群において有意に増加が見られた (Fig. 8A)。特に、FA22:6 添加群ではコントロール群に比べて 2.5 倍に増加していた。しかし、エタノール添加群と FA16:0 添加群では総 CE 量の増加は見られなかった。FC 量はどの脂肪酸添加群もコントロール群との間に有意差は認められなかった (Fig. 8B)。



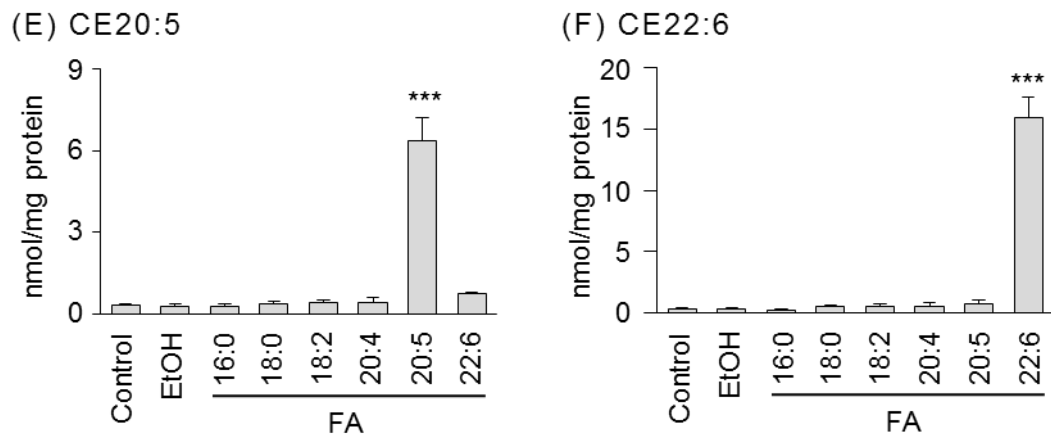


Fig. 7. 脂肪酸添加群ごとの分子種別 CE 量。HK-2 細胞にエタノール (EtOH) , パルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。* $P < 0.05$ vs control, N = 6。

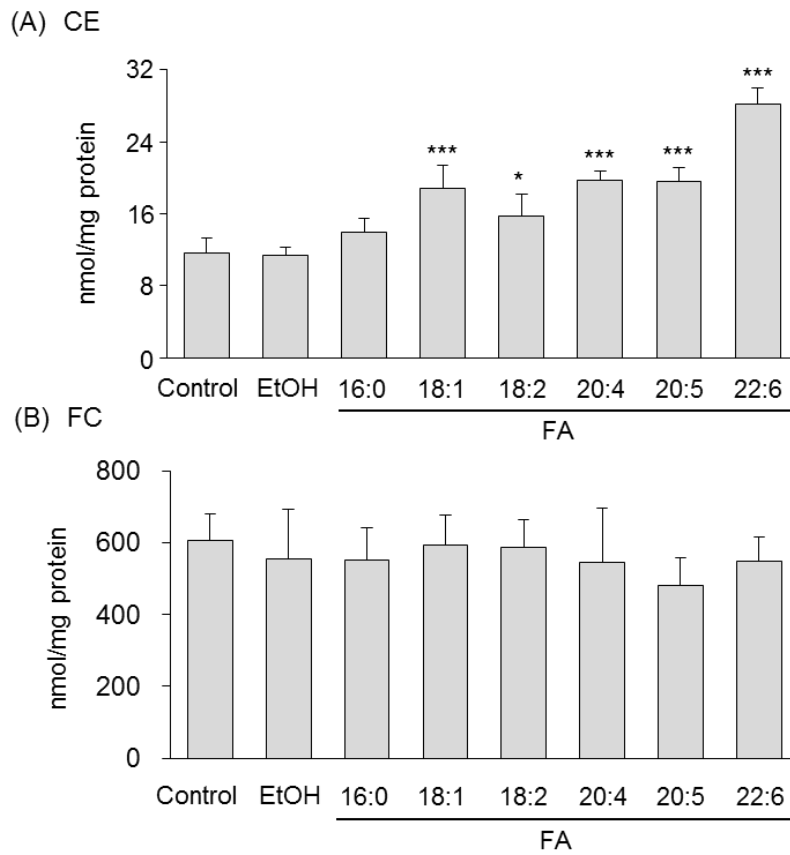


Fig. 8. (A) 脂肪酸添加群ごとの分子種別 CE 量の総和。HK-2 細胞にエタノール (EtOH) , パルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。(B) 脂肪酸添加群ごとの HK-2 細胞から抽出した FC 量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control, N = 6。

4. CL の分布

HK-2 細胞から CL を 33 分子種検出した。そのうち主要な 18 分子種を Fig. 9 に示した。コントロール群では CL70:4 や CL72:5 といった分子種が多く検出された。各脂肪酸を負荷したところ、CL72:4 のように添加した脂肪酸を有すると考えられる CL 分子種が増加したのも見られた。しかし、CL ではコントロールと比較して減少傾向にある分子種も多く見られた。各 CL 分子種の総和を脂肪酸添加群ごとに比較したところ、コントロールと比較して不飽和脂肪酸添加群において減少が見られた (Fig. 10)。

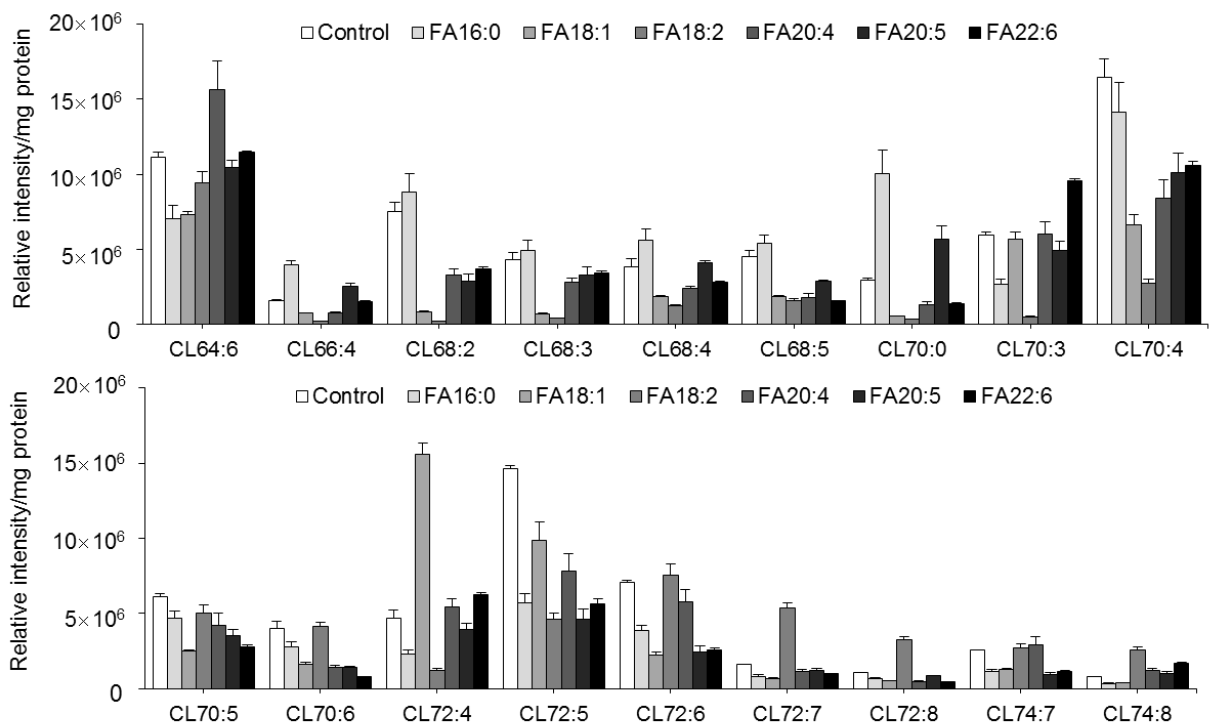


Fig. 9. 脂肪酸添加群間における CL 分子種の相対強度の比較。HK-2 細胞にパルミチン酸 (FA16:0)、オレイン酸 (FA18:1)、リノール酸 (FA18:2)、アラキドン酸 (FA20:4)、エイコサペンタエン酸 (FA20:5)、およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。* $P < 0.05$ vs control, N = 3。

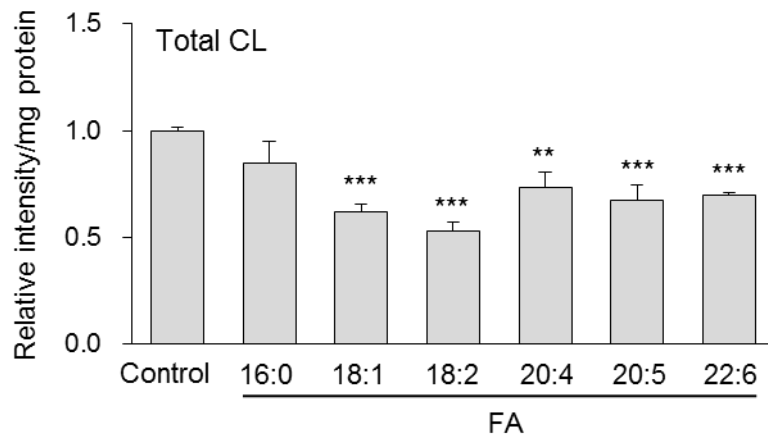


Fig. 10. 脂肪酸添加群間における CL 分子種の相対強度の和。各脂肪酸添加群の CL 量はコントロール群に対する比で示した。HK-2 細胞にパルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。N = 3。

5. CL-OOH の分布

CL の過酸化化物である CL-OOH についてその分布を確認した。CL-OOH72:4, 72:6, 72:8 の 3 分子種が検出された。FA18:1, 18:2, 20:4 を添加した際に有意な増加が見られた (Fig. 11)。

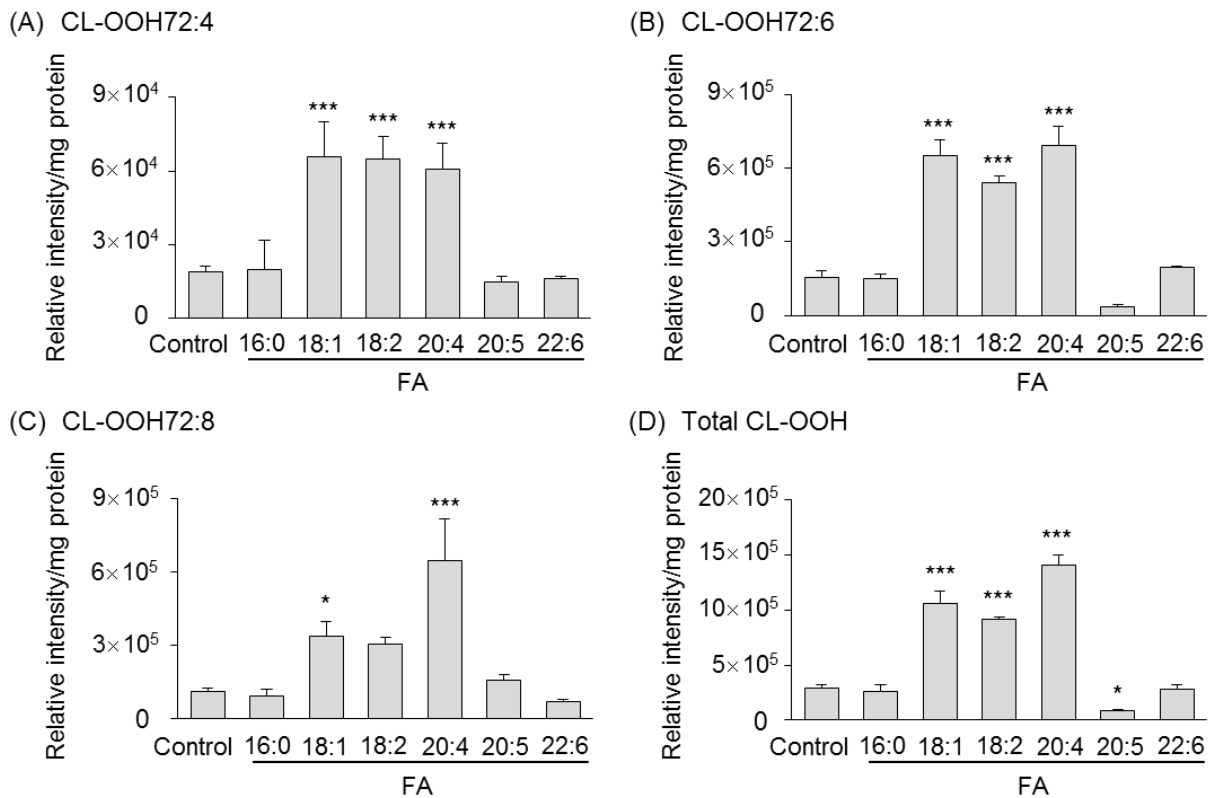


Fig. 11. 脂肪酸添加群間における CL-OOH 分子種の相対強度の比較。HK-2 細胞にパルミチン酸 (FA16:0), オレイン酸 (FA18:1), リノール酸 (FA18:2), アラキドン酸 (FA20:4), エイコサペンタエン酸 (FA20:5), およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した。* $P < 0.05$ vs control, N = 3。

6. CE と CL の関係性

各脂肪酸添加群における CE と CL 分子種の総和の関連について検討した (Fig. 12)。総 CE と総 CL の間に負の相関が見られたが、有意ではなかった ($R = -0.36$, $P = 0.08$)。

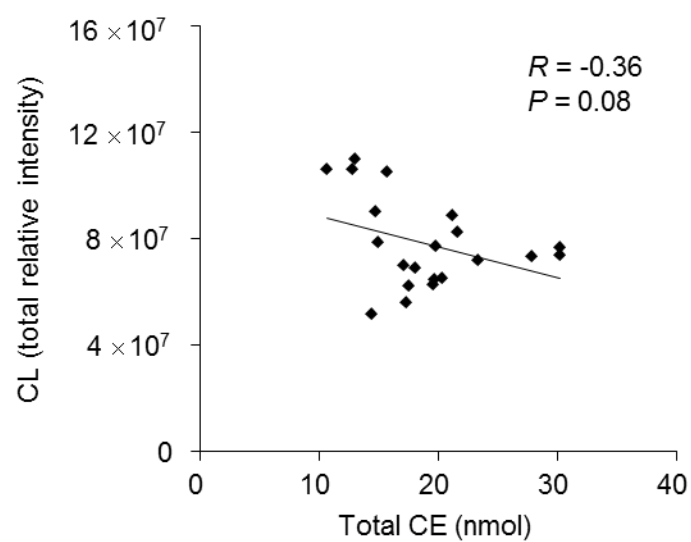


Fig. 12. HK-2 細胞における CE と CL 間の相関性。

7. Oil Red O 染色と CE および CL の関係性

各脂肪酸添加群における Oil Red O 染色の相対量と CE および CL の総和について、それぞれの平均値に対して相関を取った (Fig. 13)。脂肪滴量と CE に有意な正相関が見られた ($R = 0.79$, $P < 0.05$)。脂肪滴量と CL に負の相関が見られたが、有意ではなかった ($R = -0.73$, $P = 0.06$)。

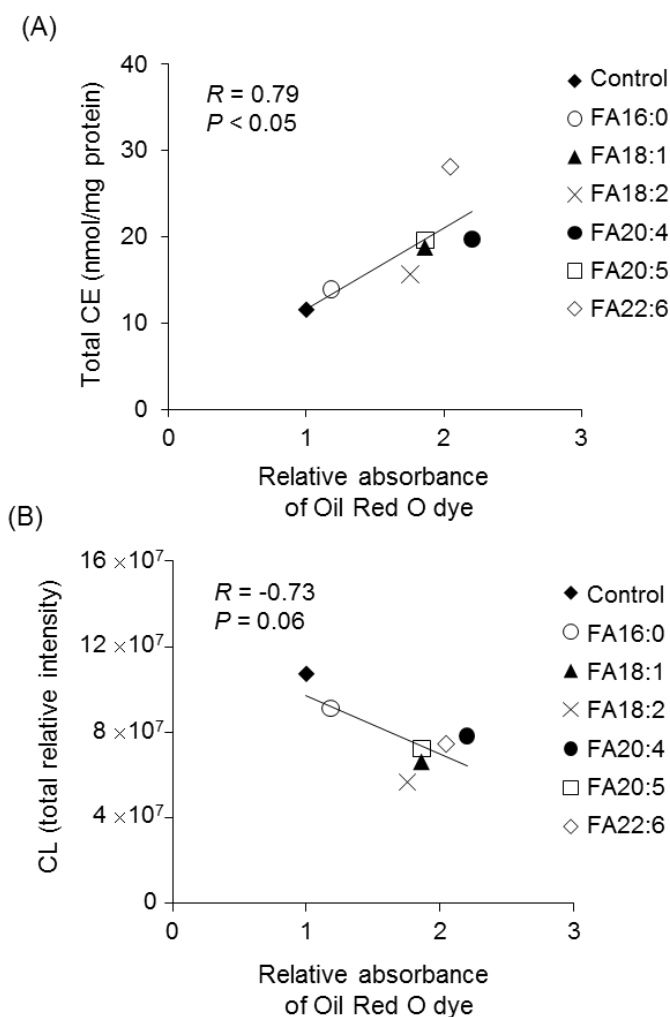


Fig. 13. Oil Red O 染色の相対量と CE および CL 間の相関。HK-2 細胞にパルミチン酸 (FA16:0)、オレイン酸 (FA18:1)、リノール酸 (FA18:2)、アラキドン酸 (FA20:4)、エイコサペンタエン酸 (FA20:5)、およびドコサヘキサエン酸 (FA22:6) をそれぞれ 100 μ M の濃度で 24 時間負荷した際に染色された Oil Red O 色素の平均値を x 軸とした。各種脂肪酸を添加した際の CE および CL の平均値を y 軸とした。

【考察】

本研究では低濃度から高濃度の種々の脂肪酸を添加し、細胞生存率を測定することで脂肪酸添加による細胞毒性を確認した (Fig. 5)。FA16:0 或いは FA18:1 添加群ではいずれの濃度においても細胞毒性が見られなかった。その一方、FA20:4, FA20:5, FA22:6 などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を添加した際に、細胞生存率は 100 μ M で上昇し、200 μ M 以上の高濃度域で低下した。同様の傾向が血管平滑筋細胞に FA22:6 を添加した際に報告されている [38]。PUFA は 100 μ M 程度の低濃度域で細胞保護効果が報告されている一方 [39,40], FA16:0 や FA18:1 を添加した場合と比較して過酸化脂質の濃度依存的な増加が見られる [41]。したがって、高濃度域では PUFA の持つ脂質毒性が細胞保護効果を上回った結果、細胞生存率の低下が起きたと予測された。

HK-2 細胞に不飽和脂肪酸 100 μ M を 24 時間負荷することで脂肪滴が形成された。一方で、飽和脂肪酸である FA16:0 を負荷した場合のみ脂肪滴は認められなかった (Fig. 6)。FA16:0 の添加による脂肪滴の形成について、HK-2 細胞や肝細胞で濃度依存的、時間依存的に増加することが報告されている [26,29,30]。そのため 100 μ M より高濃度、或いは 24 時間よりも長時間という条件で脂肪酸を負荷した場合、脂肪滴が形成される可能性がある。細胞内に形成される脂肪滴は、過剰に供給された脂質が蓄積したものであり、その組成の大半は脂質エステルで占められている [42]。本研究では CE および CL に注目し、分子種の変動を LC-MS/MS で測定した。

各種脂肪酸を HK-2 細胞に添加した際に総 CE は増加したが、FC に変化は見られなかった (Fig. 8)。細胞内 FC の大部分は細胞膜に存在し、小胞体や細胞小器官膜などにも少量であるが分布している [43]。細胞内 FC の増加は、エンドサイトーシスによるリポタンパク質の細胞内への取り込みや小胞体膜での生合成による [44]。また、細胞内 FC の減少としてコレステロールエステル化酵素による脂肪酸との結合や細胞外への排出があげられる [44]。これらの機序によって生じた FC の増加量と減少量が拮抗したために、各種脂肪酸を添加した際に FC 量に変化しなかった可能性が考えられる。Acyl-coenzyme A:cholesterolacyltransferase (ACAT) は細胞内における CE の生成を担い、ACAT1, ACAT2 と 2 種のアイソザイムが存在する。ACAT2 が腸や肝細胞に特異的に発現し、リポタンパ

ク質の形成に関与する一方で、ACAT1 は全身の組織や細胞に発現しておりコレステロールの恒常性に関与することが報告されている [45]。我々の知る限り、HK-2 細胞を用いて ACAT-1 の発現を調べた研究はない。一方で、ヒトの正常な剖検組織の近位尿細管上皮細胞において ACAT1 の発現が報告されている [46]。そのため、脂肪酸を HK-2 細胞に添加することで ACAT1 の発現量が増加し、エステル化が亢進したことが予想され得る。また、同じ濃度の脂肪酸を HK-2 細胞に添加したにもかかわらず、増加した CE 量は分子種ごとに異なった (Fig. 7)。複数のステロール構造を持つ物質を用いたエステル化反応の結果、ACAT には化学構造による特異性があることが報告されている [47]。これと同様に、脂肪酸の種類によってコレステロールとの反応性に差が生じ、CE の生成量が分子種ごとに異なると推察される。CE と Oil Red O 染色量との間に正相関が認められたことは (Fig. 13A)、脂肪滴として CE が細胞内に蓄積したことを示唆する。各脂肪酸を HK-2 細胞に添加した際に、CE の生成量と ACAT1 の発現量がどのように関連するのかは今後の研究課題である。

HK-2 細胞に脂肪酸を添加したところ、コントロールと比較して増加する CL 分子種は少なく、その総和は減少した (Fig. 9, 10)。CL の主要な脂肪酸はリノール酸 (FA18:2) であり、ヒトのリンパ球や哺乳類の心臓ではリノール酸を 4 分子含む CL72:8 が多いとされている [48–50]。一方、HK-2 では CL70:4, CL72:5 といったオレイン酸を含むと考えられる分子種が多く見られ、分子種組成が異なる (Fig. 9)。組成の違いによる CL の役割については不明であるが、組織の機能を担う上で必要である可能性がある。CE と CL 間に負の相関傾向が見られ (Fig. 11)、Oil Red O 染色量と CL の間には負の相関傾向が見られた (Fig. 13B)。CL はミトコンドリアに存在する様々なタンパク質の機能や構造を維持するうえで欠かせない脂質であり [51]、CL の減少や酸化はミトコンドリア障害につながる。脂肪滴の生成とミトコンドリア障害の機序についての推察を示す (Fig. 14)。近位尿細管上皮細胞に不飽和脂肪酸が優先的に取り込まれ、脂肪滴を形成されることで CE が増加する。脂肪滴の形成によって酸化ストレスが生じ、CL の減少および CL-OOH の増加が起り、ミトコンドリア障害を引き起こすと予想される。今後は脂肪酸の受容体遺伝子や

炎症、酸化ストレスおよびアポトーシス関連遺伝子などの発現を確認することで、脂肪滴形成に伴う細胞障害の機序を解明することが課題となる。また、CL の分析についての課題として、確立された分子種別定量法でなかったことがあげられる。Orbitrap から得られた値は半定量値であり、絶対定量値と乖離が生じている可能性がある。我々は CE の測定において両者を比較し、乖離を確認した（データは示さない）。CL でも同様の問題が生じている可能性があり、CL について分子種別の正確な定量法の確立が求められる。

腎疾患における近位尿細管上皮細胞障害と脂質に関するメカニズムは依然として解明されていない。本研究では脂肪滴形成時の CE および CL の変動が明らかとなった。今後、これらの脂質の変動と関連遺伝子の発現について検討することで、脂肪滴と腎障害の関係を明らかにしていく。

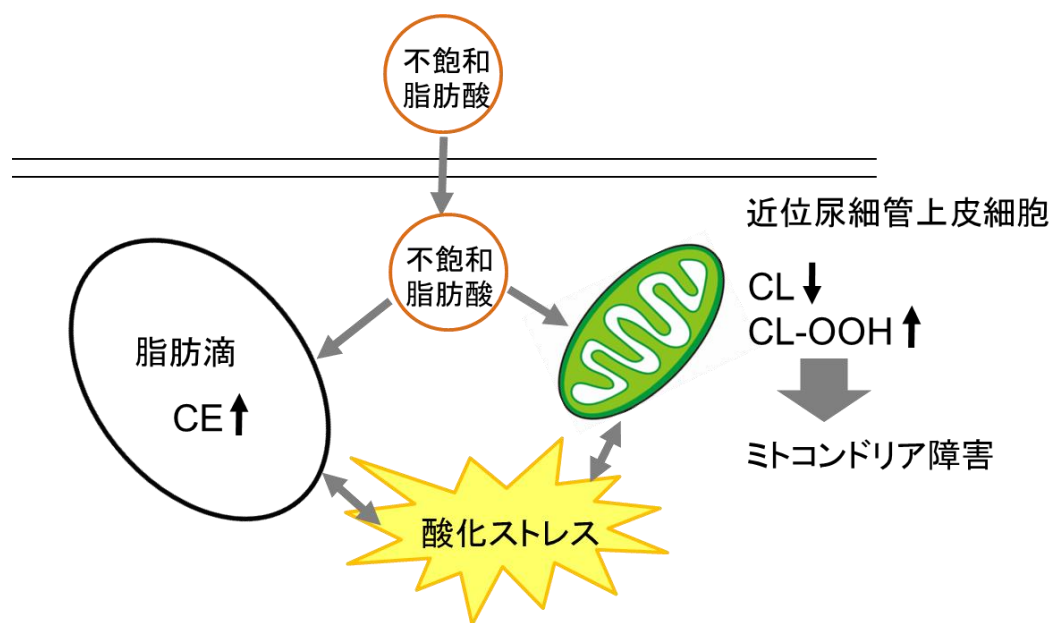


Fig. 13. 脂肪滴の生成とミトコンドリア障害の機序についての推察。

第3章 糖尿病性腎症における尿中コレステリルエステルの分析

【緒言】

尿は非侵襲かつ大量に採取できるだけでなく、血漿に由来する多くの情報を含むため、バイオマーカーを探索するうえで適した検体である [53]。腎障害における尿中バイオマーカーとして、Cystatin C, NAG, NGAL や KIM-1 などが臨床で使用されている [22]。しかし、これらのマーカーは疾患特異性が低く、複数のマーカーを測定することで 診断を行うことも少なくない [54]。また、腎障害が進行すると不可逆的な腎機能低下に至り、治療によって腎機能の悪化を遅らせる処置が取られている。そのため、腎障害の早期発見が可能なバイオマーカーや疾患特異的なバイオマーカーが求められている。

近年、質量分析法を用いて尿中のプロテオミクスやメタボロミクスを行い、様々なバイオマーカー候補が報告されている [55–57]。ところが、尿中脂質の分析例は少なく、その分子種情報は明確でない。糖尿病性腎症やネフローゼ症候群では、尿沈渣中に卵円形脂肪体や脂肪円柱などの脂質を含む構造物が見られることがある [58–60]。臨床検査では顕微鏡でこれらの脂質成分の存在を確認するものの、一般的に生化学的な脂質の測定は行われていない。我々はこれまでに、腎疾患の尿中脂質の分析において、トリグリセリド分布が腎疾患群と非腎疾患群で重なる一方（未発表データ）、コレステリルエステル（CE）は腎疾患患者に特異的に検出されることを見出した [19]。このことは、尿中 CE の腎疾患における病態生理学的な意義が大きい可能性を示している。しかし、分析した腎疾患群には糖尿病性腎症、IgA 腎症、ループス腎炎など多くの病態が含まれ、その多くが重症例であるという課題が存在した。そこで今回 CKD の原疾患として最も多いとされる糖尿病性腎症に焦点を当て、尿中 CE を分析することとした。

本研究では、糖尿病性腎症の病期ごとに尿中 CE を比較し、早期診断のバイオマーカーとなり得るか検討した。

【対象と方法】

1. 尿検体

本研究は北大保健科学研究所倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号:18-21)。尿検体は愛媛大学医学部附属病院糖尿病内科で収集されたものを使用した。アルブミン・クレアチニン比 (ACR) 30 mg/gCr 未満かつ eGFR 60mL/min/1.73m² の健常人から採取した尿をコントロールとした (N = 58)。糖尿病性腎症第 1 期 (ACR < 30 mg/gCr, eGFR ≥ 30) 57 名と第 2 期 (30 < ACR ≤ 299 mg/gCr, eGFR ≥ 30) 32 名の全尿を使用した。

2. 臨床データ

血清および尿中の臨床データは、愛媛大学医学部附属病院において測定されたものを匿名化された状態で提供された。

3. 尿中 CE の定量

全尿 50 μL に、内部標準液 (0.5 μmol/L ²H₃-CE16:0, ²H₃-CE18:0, ²H₃-CE18:1, ²H₃-CE18:2, ²H₃-CE18:3, ²H₃-CE20:4, ²H₃-CE20:5, ²H₃-CE22:6 を含むエタノール溶液) 100 μL 加えた。ヘキサン 300 μL, 脱イオン水 400 μL を加え、よく攪拌後、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して上層を回収した。上層を濃縮乾固した後、イソプロパノール 50 μL に再溶解し、LC-MS/MS 用のサンプルとした。そのうちの 10 μL 注入し、LC-MS/MS を用いて定量測定を行った。

4. 統計解析

データは平均値±標準偏差で表し、統計ソフトには EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いた。P < 0.05 を統計学的有意水準とした。図中で、*は 5%、**は 1%、***は 0.1%の危険率を示した。平均値の比較には Kruskal-Wallis 検定の後、Steel-Dwass 法による多重比較検定を行った。相関係数の算出にはピアソンの相関係数を用いた。診断能の評価には ROC の曲線下面積である AUC を用いた。

【結果】

8. 糖尿病性腎症病期別における患者背景の比較

コントロール群 (N = 58), 糖尿病性腎症第 1 期 (N = 57) および糖尿病性腎症第 2 期 (N = 32) の臨床データを Table 1 に示す。年齢, BMI およびトリグリセリドはコントロールと比較して病期が進行するほど有意に上昇していた。一方, eGFR は病期が進行するほどに低下していた。血清アルブミンは各群で有意差は見られなかった。

Table 1 糖尿病性腎症の病期別臨床データ

	Control	Stage1	Stage2
N (M/F)	58 (25/37)	57 (38/19)	32 (16/16)
Age (years)	58.9 ± 12.5	63.9 ± 11.7*	69.3 ± 8.7***
BMI	22.8 ± 4.2	24.9 ± 4.5*	25.8 ± 3.7**
Serum albumin (g/dL)	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Triglyceride (mg/dL)	89.7 ± 42.2	125.4 ± 56.2**	131.2 ± 67.4**
Total cholesterol (mg/dL)	199.7 ± 31.2	182.4 ± 29.6**	196.7 ± 33.1
HDL-C (mg/dL)	62.1 ± 15.3	54.6 ± 14.2*	61.0 ± 16.0
LDL-C (mg/dL)	122.4 ± 29.9	104.5 ± 25.5**	103.6 ± 28.9**
eGFR (mL/min/1.73m ²)	80.4 ± 10.5	73.5 ± 15.1*	65.1 ± 21.1***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control

9. 尿中 CE の定量

尿中では CE16:0, CE18:1 および CE18:2 が多く検出され, 主要な分子種であった。コントロールと糖尿病性腎症第 1 期に注目すると, CE18:2, CE18:3, CE20:4, CE20:5 で有意な増加が見られ (Fig. 15D, E, F, G), CE18:1 では有意な減少が見られた (Fig. 15C)。糖尿病性腎症 2 期ではすべての CE 分子種で有意な増加, 或いは増加傾向が見られた。総 CE はコントロールと 1 期で差は見られなかったが, 2 期では有意に増加した (Fig. 15I)。

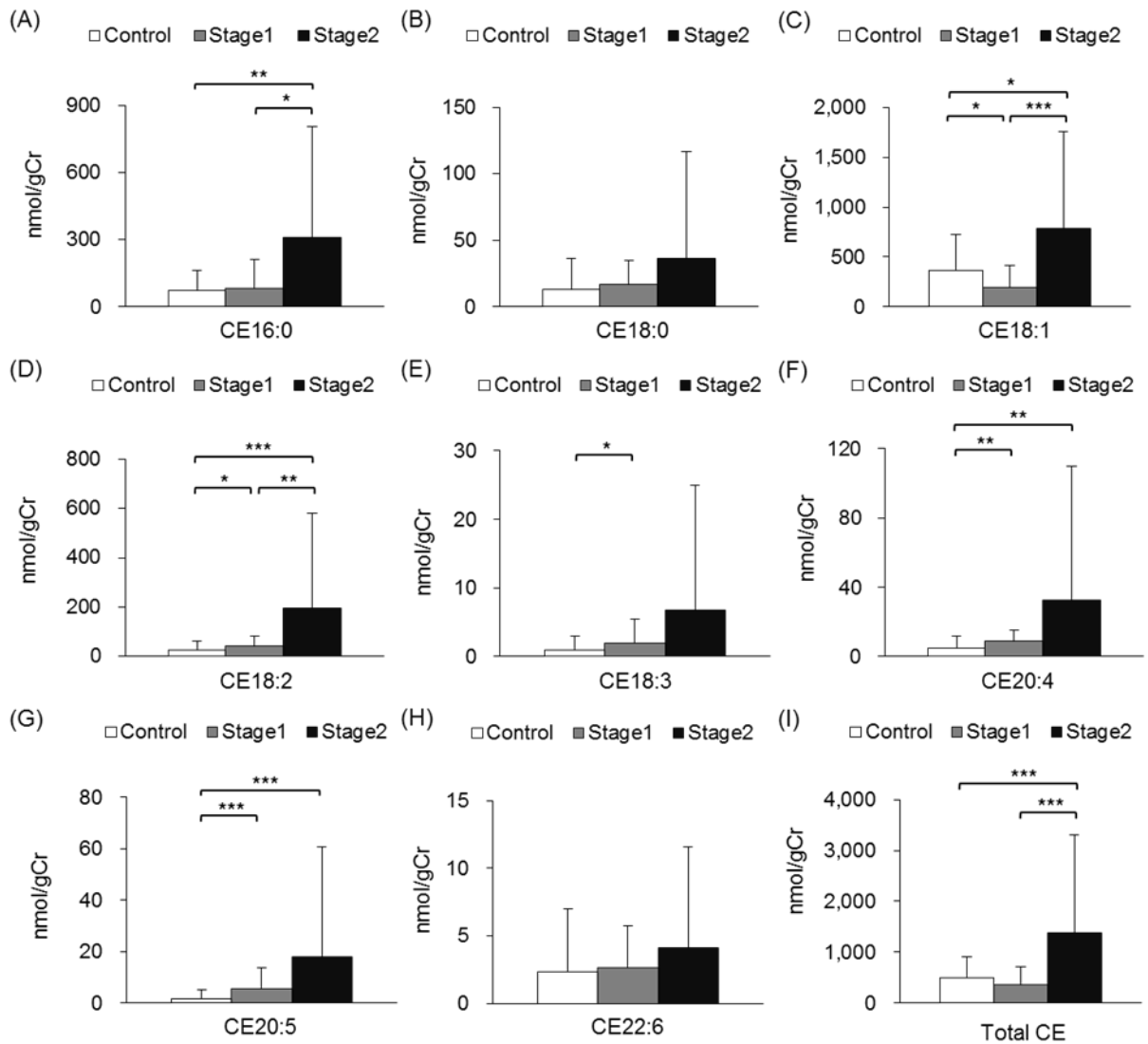


Fig. 15. コントロール群，糖尿病性腎症 1 期および 2 期における尿中 CE の比較。コントロール群は ACR 30 mg/gCr かつ eGFR 60 mL/min/1.73 m² 以上の健常人を対象とした。コントロール (N = 58)，糖尿病性腎症第 1 期 (N = 57)，2 期 (N = 32) **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs control。

11. 糖尿病性腎症第1期の診断効率

冒頭で述べたように、現在、コントロール群と糖尿病性腎症第1期群の鑑別において適切なバイオマーカーは報告されていない。Fig.14 で示したように、尿中 CE はこれを鑑別できる可能性がある。そこで、尿中 CE の有用性について ROC にて解析した結果、コントロール群と糖尿病性腎症第1期群の鑑別において、CE20:5 は ROC 解析で曲線下面積 (AUC) が 0.74 ($P < 0.001$) であり、ACR の AUC 値である 0.68 ($P < 0.001$) よりも良好であった (Fig. 16)。

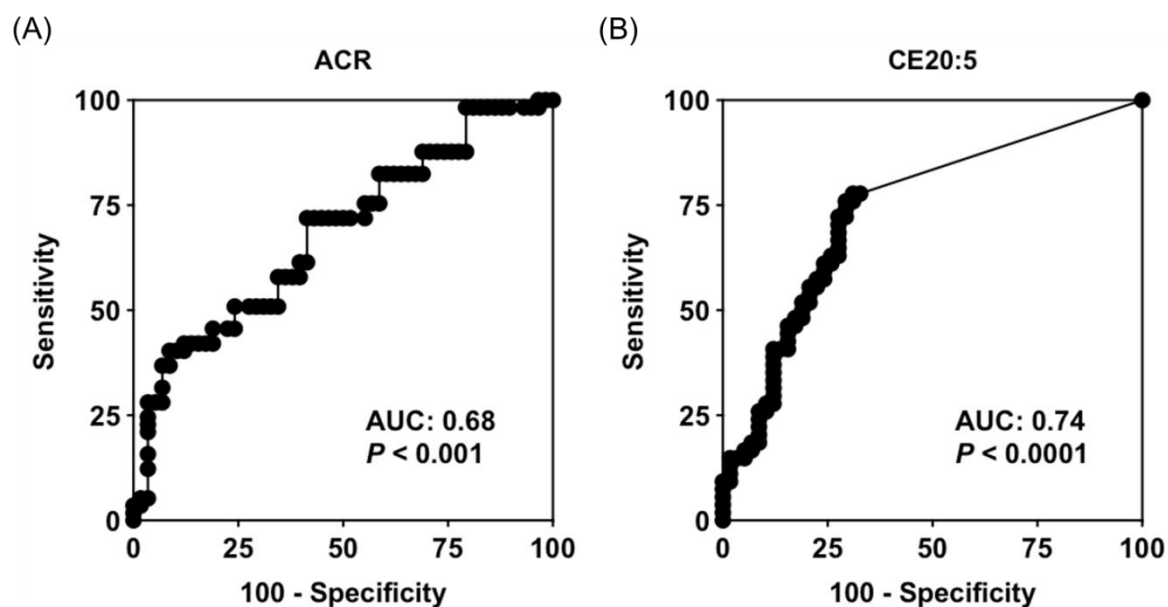


Fig. 16. 糖尿病性腎症第1期に対する (A) アルブミン・クレアチニン比 (B) CE20:5 の ROC 曲線。

【考察】

糖尿病性腎症の尿中に各 CE 分子種が検出され、多くの分子種では病期が進行するにつれて増加していた (Fig. 15)。尿中の CE が増加する機序についての推察を示す (Fig. 17)。遊離脂肪酸は血中でアルブミンに結合して存在し、糸球体障害の進行に伴い尿中にアルブミンが漏出する。従って、遊離脂肪酸も漏出していると思われる。近位尿細管細胞は漏出したアルブミンの再吸収と同時に脂肪酸を取り込み、CE を含む脂肪滴が形成されると考えられる。脂肪滴が形成されることで酸化ストレスが発生し、ミトコンドリア障害が生じる。ミトコンドリア障害が進行することで細胞死へとつながり、細胞は尿中に脱落し、尿中 CE の増加として反映されると推察する。近位尿細管上皮細胞に脂肪酸が取り込まれる他の経路として、血中から直接取り込まれる経路が考えられる。しかし、尿中 CE と血清アルブミンや血清脂質濃度と相関は認められなかったことから、尿中から取り込まれた可能性が高い。過去の我々の報告では、重度腎疾患患者の尿中タンパク質と CE が強く相関しており [19]、尿中に漏出した脂肪酸と CE は関連していると考えられる。この推察を裏付けるために尿中の遊離脂肪酸濃度を測定し、腎機能、尿中アルブミンや CE との相関性を調べるのが今後の課題となる。CE が尿中に漏出するもう一つの機序として、リポタンパク質の中で粒子径が小さい HDL が尿中に漏出し、その中に含まれる CE が反映された可能性がある。我々は腎疾患の血中と尿中で CE の比率が異なることを報告している [19]。したがって尿中 CE は糸球体から漏出された CE のみを反映したものでなく、近位尿細管上皮細胞で蓄積された脂肪滴の CE 組成を反映している可能性がある。また、尿中リン脂質組成が糸球体障害と尿細管障害で異なるという報告もあり [61]、尿細管障害で脂質組成が変化する可能性を示唆している。

コントロール群と糖尿病性腎症第 1 期の尿中 CE の比較から、尿中 Total CE には差がない一方で、CE18:2, 20:4, 20:5 が有意に増加し、CE18:1 が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 15)。よって、極早期の糖尿病性腎症の診断のために、これらの CE 分子種を質量分析により定量することが有用であると考えられる。ROC 曲線の AUC から、糖尿病性腎症 1 期の診断効率は CE20:5 が現在の臨床のスタンダードである ACR よりも良

好であった (Fig. 16)。さらに統計学手法を用いて、より有効な鑑別方法がないか検討を重ねたい。また、尿細管障害のマーカーである NAG, KIM-1 や L-FABP [62,63] などとの間で相関性を確認し、CE が特異的な尿細管障害のマーカーとなり得るか調べるのが今後の検討課題となる。他の腎疾患糖尿病性腎症以外の腎疾患 (特にアルブミン尿・蛋白尿が出現しない腎疾患 ex 腎硬化症, DKD) を測定することで、疾患特異性の点についても検討する必要があると考える。

本研究ではコントロールと糖尿病性腎症第 1 期の比較から、質量分析による CE 分子種測定の有用性が明らかとなった。今後は臨床データとの関連性を検討し、尿中 CE が糖尿病性腎症の評価や早期診断に利用できる測定法となることが期待される。

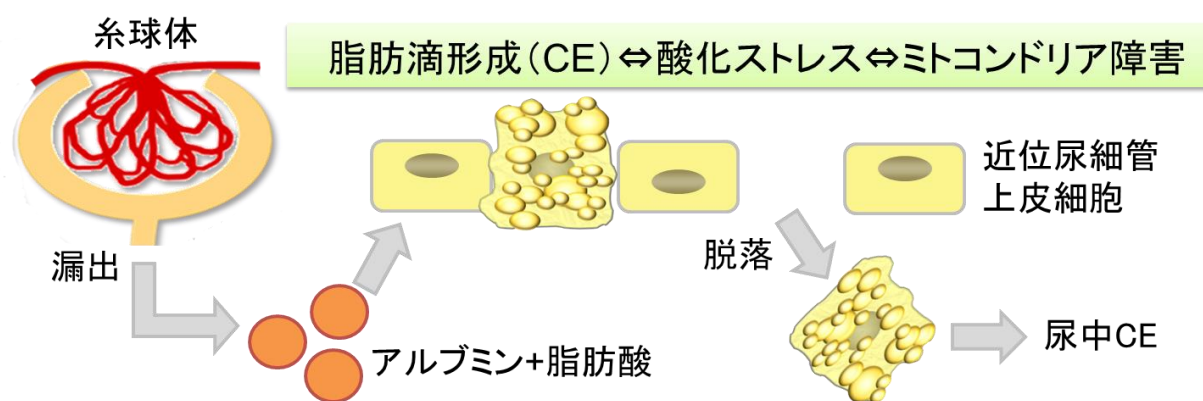


Fig. 17. 尿中への CE 出現機序についての推察

【結論】

脂肪酸の添加により HK-2 細胞に脂肪滴を形成させ、その脂質分子種の変動を解析することができた。CE および CL の変動と HK-2 細胞への障害の関連性を明らかにすることで尿細管障害における病態解明の足がかりとなる可能性がある。また、早期糖尿病性腎症患者の尿において質量分析による CE 分子種の定量が効果的であることが示された。尿中 CE20:5 は早期糖尿病性腎症の鑑別に有用となる可能性がある。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり，終始多大なる御指導，御高閲を賜りました北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野の恵 淑萍教授に深甚の謝意を申し上げます。多岐に渡る御助言，ご鞭撻を賜りました同大学健康科学分野の千葉仁志特別招へい教授に謹んで御礼申し上げます。また，本論文の作成過程におきまして多大な御指導と御協力をいただいた同大学病態解析学分野の櫻井俊宏講師に謹んで感謝の意を表します。実験の遂行に当たりご助力をいただいた同大学健康科学分野の陳震助教に深謝致します。検体提供の際に御協力賜りました愛媛大学大学院医学系研究科 糖尿病内科・臨床検査医学講座の高田康德先生に心より感謝申し上げます。最後に，本研究を進めるにあたり多大なる御協力をいただきました高度脂質分析ラボの皆様へ深謝いたします。

【文献】

- [1] K. Simons, R. Eehalt, Cholesterol , lipid rafts , and disease, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 597–603. doi:10.1172/JCI200216390.Lipid.
- [2] J.A. Kuivenhoven, H. Pritchard, J. Hill, J. Frohlich, G. Assmann, J. Kastelein, The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes, *J Lipid Res.* 38 (1997) 191–205.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162740><http://www.jlr.org/content/38/2/191.full.pdf>.
- [3] N.D. Vaziri, K. Liang, J.S. Parks, Down-regulation of hepatic lecithin:cholesterol acyltransferase gene expression in chronic renal failure, *Kidney Int.* 59 (2001) 2192–2196. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590062192.x.
- [4] A. Baylin, H. Campos, The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake, *Curr. Opin. Lipidol.* 17 (2006) 22–27. doi:10.1097/01.mol.0000199814.46720.83.
- [5] R.E. Morton, Specificity of Lipid Transfer Protein for Molecular-Species of Cholesteryl Ester, *J. Lipid Res.* 27 (1986) 523–529.
- [6] Y. Miura, T. Furukawa, M. Kobayashi, R. Shrestha, R. Takahashi, C. Shimizu, H. Chiba, S.P. Hui, Absolute quantification of cholesteryl esters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry uncovers novel diagnostic potential of urinary sediment, *Steroids.* 123 (2017) 43–49. doi:10.1016/j.steroids.2017.05.003.
- [7] M. Marklund, R. Pingel, F. Rosqvist, A.K. Lindroos, J.W. Eriksson, B. Vessby, J. Oscarsson, L. Lind, U. Risérus, Fatty Acid Proportions in Plasma Cholesterol Esters and Phospholipids Are Positively Correlated in Various Swedish Populations, *J. Nutr.* (2017) jn254250. doi:10.3945/jn.117.254250.
- [8] M.Y. Abeywardena, R.J. Head, Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function, *Cardiovasc. Res.* 52 (2001) 361–371.
doi:10.1016/S0008-6363(01)00406-0.

- [9] A. Mullen, C.E. Loscher, H.M. Roche, Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages, *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 444–450. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.02.008.
- [10] R. Laaksonen, Identifying new Risk Markers and Potential Targets for Coronary Artery Disease: The Value of the Lipidome and Metabolome, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 30 (2016) 19–32. doi:10.1007/s10557-016-6651-8.
- [11] Y. Miura, S.P. Hui, R. Shrestha, T. Hiruma, S. Takeda, H. Fuda, S. Ikegawa, K.I. Hirano, H. Chiba, Synthesis of (2 β ,3 α ,6-2H $_3$)cholesteryl linoleate and cholesteryl oleate as internal standards for mass spectrometry, *Steroids.* 107 (2016) 1–9. doi:10.1016/j.steroids.2015.12.004.
- [12] R. Tautenhahn, C. Bottcher, S. Neumann, Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS, *BMC Bioinformatics.* 9 (2008) 1–16. doi:10.1186/1471-2105-9-504.
- [13] S. Yu, J. Dong, W. Zhou, R. Yang, H. Li, H. Zhao, T. Zhang, H. Guo, S. Wang, C. Zhang, W. Chen, A rapid and precise method for quantification of fatty acids in human serum cholesteryl esters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 960 (2014) 222–229. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.040.
- [14] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression: A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta.* 115 (2013) 104–122. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- [15] E. Stokvis, H. Rosing, J.H. Beijnen, Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: Necessity or not?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 401–407. doi:10.1002/rcm.1790.
- [16] KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation,

- and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease, *Kidney Int. Suppl.* 8 (2018) 91–165. doi:10.1016/j.kisu.2018.06.001.
- [17] M.C. Bulbul, T. Dagel, B. Afsar, N.N. Ulusu, M. Kuwabara, A. Covic, M. Kanbay, Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease, *Blood Purif.* 46 (2018) 144–152. doi:10.1159/000488816.
- [18] Y.-Y. Zhao, Metabolomics in chronic kidney disease, *Clin. Chim. Acta.* 422 (2013) 59–69. doi:10.1016/j.cca.2013.03.033.
- [19] S. Lopez-Giacoman, Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage, *World J. Nephrol.* 4 (2015) 57. doi:10.5527/wjn.v4.i1.57.
- [20] T. Liyanage, T. Ninomiya, V. Jha, B. Neal, H.M. Patrice, I. Okpechi, M.H. Zhao, J. Lv, A.X. Garg, J. Knight, A. Rodgers, M. Gallagher, S. Kotwal, A. Cass, V. Perkovic, Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review, *Lancet.* 385 (2015) 1975–1982. doi:10.1016/S0140-6736(14)61601-9.
- [21] S.Y. Lee, M.E. Choi, Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria, *Pediatr. Nephrol.* 30 (2015) 1063–1075. doi:10.1007/s00467-014-2888-2.
- [22] R.G. Fassett, S.K. Venuthurupalli, G.C. Gobe, J.S. Coombes, M. a Cooper, W.E. Hoy, Biomarkers in chronic kidney disease: a review, *Kidney Int.* 80 (2011) 806–821. doi:10.1038/ki.2011.198.
- [23] H. Birn, E.I. Christensen, Renal albumin absorption in physiology and pathology, *Kidney Int.* 69 (2006) 440–449. doi:10.1038/sj.ki.5000141.
- [24] E. Homeostasis, S. Invited, Water and Electrolyte Homeostasis Section Invited Reviews The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney, (2011). doi:10.1152/ajpregu.00809.2010.
- [25] M. Herman-Edelstein, P. Scherzer, A. Tobar, M. Levi, U. Gafter, Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy, *J. Lipid*

- Res. 55 (2014) 561–572. doi:10.1194/jlr.P040501.
- [26] H.R. Yao, J. Liu, D. Plumeri, Y.B. Cao, T. He, L. Lin, Y. Li, Y.Y. Jiang, J. Li, J. Shang, Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids, *Am. J. Transl. Res.* 3 (2011) 284–291.
- [27] Q. Chen, Y. Su, Y. Ju, K. Ma, W. Li, W. Li, Astragalosides IV protected the renal tubular epithelial cells from free fatty acids-induced injury by reducing oxidative stress and apoptosis, *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 679–686. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.049.
- [28] N. Zuo, X. Zheng, H. Liu, X. Ma, Fenofibrate, a PPAR α agonist, protect proximal tubular cells from albumin-bound fatty acids induced apoptosis via the activation of NF- κ B, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 10653–10661.
- [29] E. Katsoulieris, J.G. Mabley, M. Samai, M.A. Sharpe, I.C. Green, P.K. Chatterjee, Lipotoxicity in renal proximal tubular cells: Relationship between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathways, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1654–1662. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.021.
- [30] W. Xin, X. Zhao, L. Liu, Y. Xu, Z. Li, L. Chen, X. Wang, F. Yi, Q. Wan, Acetyl-CoA carboxylase 2 suppression rescues human proximal tubular cells from palmitic acid induced lipotoxicity via autophagy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 364–369. doi:10.1016/j.bbrc.2015.05.070.
- [31] D.A.I. Jr, J.A. Post, M.M. Van Timmeren, S.J.L. Bakker, R. Goldschmeding, H.A. Koomans, B. Braam, Albumin-bound fatty acids induce mitochondrial oxidant stress and impair antioxidant responses in proximal tubular cells, *Kidney Int.* 70 (2006) 724–731. doi:10.1038/sj.ki.5001629.
- [32] Y. Urahama, Y. Ohsaki, Y. Fujita, S. Maruyama, Y. Yuzawa, S. Matsuo, T. Fujimoto, Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 1286–1294. doi:10.2353/ajpath.2008.080137.

- [33] L. Feng, C. Gu, Y. Li, J. Huang, High Glucose Promotes CD36 Expression by Upregulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Levels to Exacerbate Lipid Deposition in Renal Tubular Cells, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017). doi:10.1155/2017/1414070.
- [34] I.A. Bobulescu, Renal lipid metabolism and lipotoxicity, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19 (2010) 393–402. doi:10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac.
- [35] A.J. Chicco, G.C. Sparagna, Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease, *AJP Cell Physiol.* 292 (2006) C33–C44. doi:10.1152/ajpcell.00243.2006.
- [36] M. Ott, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 1243–1247. doi:10.1038/sj.cdd.4402135.
- [37] Z. Chen, Y. Wu, Y.S. Ma, Y. Kobayashi, Y.Y. Zhao, Y. Miura, H. Chiba, S.P. Hui, Profiling of cardiolipins and their hydroperoxides in HepG2 cells by LC/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5735–5745. doi:10.1007/s00216-017-0515-3.
- [38] K. Nagayama, K. Morino, O. Sekine, F. Nakagawa, A. Ishikado, H. Iwasaki, T. Okada, M. Tawa, D. Sato, T. Imamura, Y. Nishio, S. Ugi, A. Kashiwagi, T. Okamura, H. Maegawa, Duality of N-3 polyunsaturated fatty acids on Mcp-1 expression in vascular smooth muscle: A potential role of 4-hydroxy hexenal, *Nutrients.* 7 (2015) 8112–8126. doi:10.3390/nu7095381.
- [39] H. Li, X.Z. Ruan, S.H. Powis, R. Fernando, W.Y. Mon, D.C. Wheeler, J.F. Moorhead, Z. Varghese, EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: Evidence for a PPAR- γ -dependent mechanism, *Kidney Int.* 67 (2005) 867–874. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00151.x.
- [40] M. Jiang, H. Zhang, L. Zhai, B. Ye, Y. Cheng, C. Zhai, ALA/LA ameliorates glucose toxicity on HK-2 cells by attenuating oxidative stress and apoptosis through the ROS/p38/TGF- β 1 pathway, *Lipids Health Dis.* 16 (2017) 1–11.

doi:10.1186/s12944-017-0611-6.

- [41] D. a Healy, R.W.G. Watson, P. Newsholme, Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line., *Clin. Sci. (Lond)*. 104 (2003) 171–9. doi:10.1042/CS20020223.
- [42] D. Zweytick, K. Athenstaedt, G. Daun, Intracellular lipid particles of eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta*. 1469 (2000) 101–120. doi:10.1016/S0005-2736(00)00294-7.
- [43] F.R. Maxfield, D. Wüstner, Intracellular cholesterol transport, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 891–898. doi:10.1172/JCI16500.
- [44] I. Tabas, Consequences of cellular cholesterol accumulation : Basic concepts and physiological implications, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 905–911. doi:10.1172/JCI200216452.The.
- [45] L.L. Rudel, R.G. Lee, T.L. Cockman, Acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase types 1 and 2: Structure and function in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 12 (2001) 121–127. doi:10.1097/00041433-200104000-00005.
- [46] N. Sakashita, A. Miyazaki, M. Takeya, S. Horiuchi, C.C.Y. Chang, T.Y. Chang, K. Takahashi, Localization of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 227–236. doi:10.1016/S0002-9440(10)64723-2.
- [47] D.S. Lin, R.D. Steiner, L.S. Merkens, A.S. Pappu, W.E. Connor, The effects of sterol structure upon sterol esterification, *Atherosclerosis*. 208 (2010) 155–160. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.031.
- [48] Y.Y. Tyurina, D.E. Winnica, V.I. Kapralova, A.A. Kapralov, V.A. Tyurin, V.E. Kagan, LC/MS characterization of rotenone induced cardiolipin oxidation in human lymphocytes: Implications for mitochondrial dysfunction associated with

- parkinson's disease, *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013) 1410–1422.
doi:10.1002/mnfr.201200801.
- [49] P.E. Minkler, C.L. Hoppel, Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 856–865. doi:10.1194/jlr.D002857.
- [50] G.C. Sparagna, C.A. Johnson, S.A. McCune, R.L. Moore, R.C. Murphy, Quantitation of cardiolipin molecular species in spontaneously hypertensive heart failure rats using electrospray ionization mass spectrometry., *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1196–1204. doi:10.1194/jlr.M500031-JLR200.
- [51] M. Schlame, D. Rua, M.L. Greenberg, The biosynthesis and functional role of cardiolipin, *Prog. Lipid Res.* 39 (2000) 257–288. doi:10.1016/S0163-7827(00)00005-9.
- [52] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 437 (2011) 575.1-575. doi:10.1042/BJ4370575u.
- [53] S. Decramer, A. Gonzalez de Peredo, B. Breuil, H. Mischak, B. Monsarrat, J.-L. Bascands, J.P. Schanstra, Urine in clinical proteomics., *Mol. Cell. Proteomics.* 7 (2008) 1850–62. doi:10.1074/mcp.R800001-MCP200.
- [54] M.E. Wasung, L.S. Chawla, M. Madero, Biomarkers of renal function, which and when?, *Clin. Chim. Acta.* 438 (2015) 350–357. doi:10.1016/j.cca.2014.08.039.
- [55] J.P. Schanstra, H. Mischak, Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation, *Pediatr. Nephrol.* 30 (2015) 713–725. doi:10.1007/s00467-014-2790-y.
- [56] M. Breit, K.M. Weinberger, Metabolic biomarkers for chronic kidney disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 589 (2016) 62–80. doi:10.1016/j.abb.2015.07.018.
- [57] J. Klein, J.L. Bascands, H. Mischak, J.P. Schanstra, The role of urinary peptidomics in kidney disease research, *Kidney Int.* 89 (2016) 539–545. doi:10.1016/j.kint.2015.10.010.

- [58] G.J. Becker, K. Nicholls, Lipiduria - With special relevance to Fabry disease, *Clin. Chem. Lab. Med.* 53 (2015) S1465–S1470. doi:10.1515/cclm-2015-0499.
- [59] J.R. Quinn, H.J. Zimmerman, Significance of Oval Fat Bodies in Urinary Sediment, *Am. J. Clin. Pathol.* 24 (1954) 787–795. doi:10.1093/ajcp/24.7.787.
- [60] W.M. O'Neill, J.D. Wallin, P.D. Walker, Hematuria and red cell casts in typical diabetic nephropathy, *Am. J. Med.* 74 (1983) 389–395. doi:10.1016/0002-9343(83)90956-7.
- [61] W.L. Yang, Q. Bai, D.D. Li, T.L. A, S. Wang, R.S. Zhao, H.G. Nie, A.H. Zhang, T. Wang, M.H. Fan, Changes of urinary phospholipids in the chronic kidney disease patients, *Biomarkers.* 18 (2013) 601–606. doi:10.3109/1354750X.2013.837100.
- [62] K. Matsui, A. Kamijo-Ikemori, T. Sugaya, T. Yasuda, K. Kimura, Usefulness of Urinary Biomarkers in Early Detection of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery in Adults, *Circ. J.* 76 (2012) 213–220. doi:10.1253/circj.CJ-11-0342.
- [63] N.M. Panduru, C. Forsblom, M. Saraheimo, L. Thorn, A. Bierhaus, P.M. Humpert, P.H. Groop, Urinary liver-type fatty acid-binding protein and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes, *Diabetes Care.* 36 (2013) 2077–2083. doi:10.2337/dc12-1868.

【業績リスト】

論文

1. Shrestha R, Miura Y, Hirano K-I, Chen Z, Okabe H, Chiba H, Hui S-P. Microwave-assisted derivatization of fatty acids for its measurement in milk using high-performance liquid chromatography. *Anal. Sci.* 34:16–20, (2018). doi: 10.2116/analsci.17P557
2. Chen Z, Zang L, Wu Y, Nakayama H, Shimada Y, Shrestha R, Zhao Y, Miura Y, Chiba H, Hui S-P, Nishimura N. Lipidomic Profiling on Oxidized Phospholipids in Type 2 Diabetes Mellitus Model Zebrafish. *Anal. Sci.* 34:1201-1208, (2018).
3. Chen Z, Wu Y, Shrestha R, Gao Z, Zhao Y, Miura Y, Tamakoshi A, Chiba H, Hui S-FA16:0NNALS EXPRESS: Determination of Total, Free, and Esterified Short-Chain Fatty Acid in Human Serum by LC-MS/MS. *Ann Clin Biochem* 4563218801393. (2018). doi: 10.1177/0004563218801393
4. Miura Y, Furukawa T, Kobayashi M, Shrestha R, Takahashi R, Shimizu C, Chiba H, Hui SFA16:0bsolute quantification of cholesteryl esters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry uncovers novel diagnostic potential of urinary sediment. *Steroids.* 123:43-49, (2017)
5. Shrestha R, Hirano K-I, Suzuki A, Yamaguchi S, Miura Y, Chen Y-F, Mizuta M, Chiba H, Hui S-P. Change in PFA18:2sma Total, Esterified and Non-esterified Capric Acid Concentrations during a Short-term OraFA18:2dministration of Synthetic Tricaprin in Dogs. *Anal Sci* 33:1297–1303. (2017)doi: 10.2116/analsci.33.1297
6. Chen Z, Wu Y, Ma Y-S, Kobayashi Y, Zhao Y-Y, Miura Y, Chiba H, Hui S-P Profiling of cardiolipins and their hydroperoxides in HepG2 cells by LC/MS. *Anal BiFA18:1nal Chem* 409:5735–5745. (2017). doi: 10.1007/s00216-017-0515-3
7. Miura Y, Hui SP, Shrestha R, Hiruma T, Takeda S, Fuda H, Ikegawa S, Hirano K,

- Chiba H. Synthesis of (2S,3R,6'-²H₃)cholesteryl linoleate and cholesteryl oleate as internal standards for mass spectrometry. *Steroids*. 107:1-9, (2016).
8. Watanabe M, Fuda H, Okabe H, Joko S, **Miura Y**, Hui SP, Yimin, Hamaoka N, Miki E, Chiba H. Oyster extracts attenuate pathological changes in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *J Funct Foods*. 20:516-531, (2016).
 9. Shrestha R, Hui SP, **Miura Y**, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Fuda H, Chiba H. Identification of molecular species of oxidized triglyceride in plasma and its distribution in lipoproteins. *Clin Chem Lab Med*. 53:1859-69, (2015).
 10. Okabe H, Hui SP, Fuda H, Furukawa T, Takeda S, Shrestha R, **Miura Y**, Watanabe M, Chiba H. Mass Spectrometric Quantification of Amphiphilic, Polyphenolic Antioxidant of Specific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Anal Sci*. 31:1341-4, (2015).

学会発表

1. LC/MS によるヒト血清中における分子種別コレステリルエステルの定量分析, 三浦佑介, 加藤颯太, 櫻井俊宏, 陳 震, 呉 玥, 高紫君, ロゼット シュルスタ, 中村幸志, 鶴川重和, 中川貴史, 玉腰暁子, 千葉仁志, 惠淑萍, 第 43 回日本医用マススペクトル学会年会, 北海道大学, 2018 年 9 月
2. LC-MS/MS による短鎖, 中鎖, 長鎖, 極長鎖脂肪酸の一斉定量分析, 高 紫君, 陳 震, 呉 玥, 三浦佑介, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第 43 回日本医用マススペクトル学会年会, 北海道大学, 2018 年 9 月
3. LC/MS を用いたカルジオリピン過酸化物の分析, 陳 震, 呉 玥, 小林 悠, 趙 瑤瑤, 三浦佑介, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第 43 回日本医用マススペクトル学会年会, 北

海道大学, 2018年9月

4. LC-MS/MSによる糖尿病性腎症患者の尿中コレステリルエステル分析, 辻川 諒哉, 三浦佑介, 陳 震, 高田康徳, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第43回日本医用マススペクトル学会年会, 北海道大学, 2018年9月
5. 近位尿細管上皮細胞の脂肪酸負荷による脂質変化, 三浦佑介, 櫻井俊宏, 陳震, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第58回日本臨床化学会年次学術集会, 名古屋国際会議場, 2018年8月
6. Determination of butanoic and caproic acid in human serum by LC-MS/MS, 陳 震, 吳 玥, Роберт Шулста, 三浦佑介, 趙 瑤瑤, 玉腰暁子 2, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第58回日本臨床化学会年次学術集会, 名古屋国際会議場, 2018年8月
7. 腎疾患における尿中バイオマーカーとしてのコレステリルエステルの有用性, 三浦佑介, 古川貴之, 小林美穂, 清水力, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第24回日本未病システム学会学術総会, ワークピア横浜, 2017年11月
8. ヒト近位尿細管上皮細胞における蓄積脂質の分析, 三浦佑介, 櫻井俊宏, 津久井隆行, 陳震, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第57回日本臨床化学会年次学術集会, 北海道大学, 2017年10月
9. LC-MS/MSによる近位尿細管上皮細胞の脂質分析, 三浦佑介, 櫻井俊宏, 津久井隆行, 陳震, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍, 第42回日本医用マススペクトル学会年会, 一橋講堂, 2017年9月
10. LC-MS/MSによるコレステリルエステル定量法の開発, 三浦佑介, 惠 淑萍, 高橋遼地, 千葉仁志, 第55回日本臨床化学会年次学術集会, 大阪大学, 2015年10月
11. 尿中コレステリルエステルは腎脂質代謝を反映する三浦佑介, 惠 淑萍, 小林美穂, 清水力, 千葉仁志, 第22回日本未病システム学会学術総会, 北海道大学, 2015年10月
12. 新規コレステリルエステル定量法の開発と臨床検体への応用, 三浦佑介, 高橋遼地, 惠 淑萍, 第10回日本臨床検査教育学教育学会学術大会, 信州大学, 2015年8月

13. 多重重水素標識コレステロールの合成, 三浦佑介, 惠 淑萍, 池川繁男, 千葉仁志, 第 54 回日本臨床化学会年次学術集会, 東京大学, 2014 年 9 月
14. 重水素標識コレステリルエステルの合成, 三浦佑介, 惠 淑萍, 千葉仁志, 第 9 回日本臨床検査教育学教育学会学術大会, 大田区産業プラザ, 2014 年 8 月
15. グリセリンカプリン酸エステルの合成, 三浦佑介, 惠 淑萍, 池川繁男, 千葉仁志, 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, あわぎんホール, 2013 年 8 月