

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

プロテオーム解析による糖尿病性細小血管症の早期
診断マーカーの探索

H20-バイオ-一般-009

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 春日 雅人

平成21 (2009) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告

糖尿病におけるバイオマーカー探索研究の現状と今後の展望 1

春日 雅人

II. 分担研究報告

1. cICAT 法での糖尿病患者血清解析データの多変量解析による検討 . . . 7

野田 光彦

2. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析 13

鎗木 康志

3. 糖尿病自然発症 LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析 20

鎗木 康志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 24

I. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告書

糖尿病におけるバイオマーカー探索研究の現状と今後の展望

研究代表者 春日 雅人

国立国際医療センター(研究所) 所長

研究要旨

近年急増している糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を合併することであり、その進行と共に失明、腎不全、下肢切断等の重篤な合併症を引き起こすことによって、国民健康上大きな問題になっている。本計画では、この糖尿病性細小血管症を早期に診断可能な血清及び尿のバイオマーカー探索を目的として、プロテオーム解析の手法を用いて健常者及び糖尿病患者由来の血清、尿を試料として糖尿病性細小血管症関連蛋白を探索する。本稿では、糖尿病性細小血管症診断バイオマーカー探索を開始するにあたって、その課題及びそれを克服するためのストラテジーについて概説する。

糖尿病でのプロテオーム研究の位置づけ

2007年から11月14日に青にライトアップされた東京タワーがニュースで報道され出したのは記憶に新しいところだが、これは2006年に国連が定めた「世界糖尿病デー」を記念して行われましたものである。このような記念日が制定された理由は全世界でも糖尿病が増加していることであり、現在の糖尿病患者は成人人口の約5%である2億4600万人、糖尿病による合併症による死亡者は年間380万人以上となっている。また、世界の糖尿病患者は2025年には2007年の60%以上増の3億8000万人と推計されており、発展途上国を含む全世界で脅威になっている。日本においても近年、糖尿病を含む生活習慣病は急激しており、厚生労働省の06年国民健康・栄養調査では糖尿病有病者（820万人）と糖尿病の可能性のある「予備軍」（1050万人）を合わせると、約1870万人といわれ、4年前の調査と比較しても15%以上増加している。この調査において、糖尿病と関連性の深い生活習慣病である高血圧は有病者及び正常高値高血圧者を含めて5490万人、脂質異常者は1410万人、メタボリックシンドロームは予備軍を含めて1940万人と急増している。さらに最新の07年国民健康・栄養調査では、糖尿病有病者

（890万人）と糖尿病の可能性のある「予備軍」（1320万人）を合わせると、約2210万人といわれ、1年前との比較で18%以上増加とその増加のスピードはさらに高まっている。また、肥満を背景としてメタボリックシンドロームから糖尿病となる過程で動脈硬化によって起こる脳卒中、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症などの大血管障害が増加しているが、糖尿病では固有の細小血管症が腎不全、失明、下肢切断の主要な原因となると共に、動脈硬化による疾患も通常の3倍に増加しており、今や糖尿病関連医療費は総医療費32兆円の約10%を占めている（図1）。

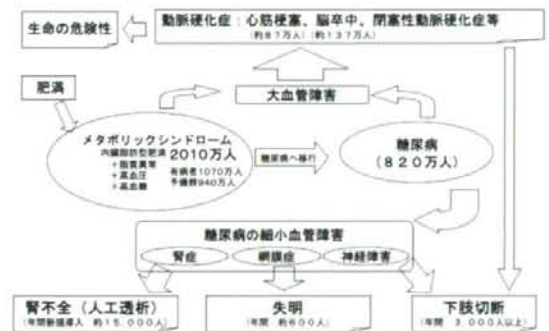


図1. 国内の糖尿病と合併症発症の病態と実態

上述した糖尿病患者の増加は最近起こったことではなく、日本においても糖尿病患者は第2次世界大戦後に一貫して増加し、現在は第2次世界大戦直後の約50倍になっている。このような糖尿病患者急増の原因の一つとして遺

伝的要因が挙げられ、最近のゲノムワイド解析研究によって、今まで糖尿病の原因となりうるとは考えられていなかった10個以上の遺伝子が糖尿病の発病に関与することが明らかになってきた。但し、発見された個々の糖尿病関連遺伝子によって糖尿病が発病する確立は低く、糖尿病の発症にはこれらの遺伝因子とエネルギー及び脂肪摂取量、運動量の変化等の多くの環境因子が複雑に絡み合いながら関与していると考えられている（図2）。

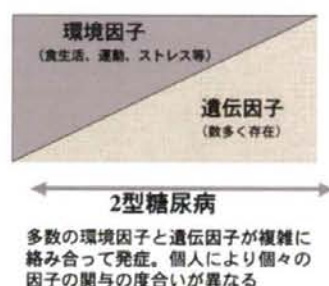


図2. 2型糖尿病の発症と遺伝及び環境因子の相互作用

このため、一人一人の糖尿病患者の発症メカニズムは異なることが予想され、各糖尿病患者にて糖尿病発症の原因となった蛋白を同定するのは困難である。一方、動物実験ではこれらの遺伝要因や環境因子をコントロールすることが可能であるため、糖尿病発症の原因蛋白の探索には有用であるが、同定された候補蛋白が人での糖尿病発症に関与している

か、さらに検証する必要がある。

糖尿病患者の予後及び生活の質に深く関与する合併症は糖尿病に固有な細小血管症と動脈硬化によって起こる大血管症に大別され、膵島β細胞が自己免疫の異常によって破壊されてインスリンが欠乏する1型糖尿病、インスリン抵抗性とインスリン分泌低下の両者が原因で起こる2型糖尿病のいずれでも起こる。細小血管症が長期の血糖レベルにその発症及び進行が強く依存するのに対して、大血管症は糖尿病に固有な合併症ではなく、糖尿病以外のリスクファクター（高血圧、高脂血症、肥満、喫煙等）もその発症及び進行に関与する。これらの二つの血管症は1型糖尿病及び2型糖尿病のいずれでも、それぞれのリスクファクターの存在下で同様に進行するため、血管合併症についてはその原因あるいは指標となる蛋白あるいは蛋白群が、糖尿病の成因に関わらず共通である可能性は高い。このため、これらの血管合併症、特に細小血管症については、その診断マーカーあるいは治療標的分子を糖尿病患者由来サンプルからプロテオーム解析の手法で探索することは有意義であると考えられる。

プロテオーム解析のための糖尿病患者由来サンプルとしては、血液が糖尿病診療の現場で日常的に採取されるため、血清はバイオマーカー探索のため

の第一の研究対象となる。ところが、糖尿病は全身疾患であるため、その発症の原因となる臓器（肝臓、骨格筋、脂肪組織、膵臓等）及び合併症の場となる組織（腎臓、網膜、神経、血管等）に由来する蛋白を血清から検出することは理論上可能であるが、同定された血清蛋白から由来する臓器あるいは組織を特定するのは困難である。また、大血管症は糖尿病に固有ではなく、他のリスクファクター（高血圧、高脂血症、喫煙等）の有無によっては糖尿病がなくても大血管症が進行している可能性があり、また糖尿病においても大血管症のリスクは糖尿病の前段階である耐糖能異常から高まるため、大血管症のバイオマーカー探索では健常者コントロール及び対象患者の選択を慎重に行う必要がある。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、糖尿病患

者由来検体の網羅的同定を行い、病態に関連した蛋白を検索することは、新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発のために意義のある試みと考える。前回の解析では、比較的少数の糖尿病患者由来血清及び尿の解析によって、糖尿病及び合併症によって有意に変動する蛋白を多数同定することができた。今回の計画において糖尿病性合併症の診断に有用なバイオマーカーを探索するにあたっての改善点としては、解析する検体数の増加、より多数の蛋白の定量が可能な iTRAQ 法に解析法を変更、検体収集する際に糖尿病性合併症及び大血管症についての客観的情報の系統的かつ網羅的な取得、得られた蛋白プロファイルと臨床情報からの多変量解析による多面的解析等が挙げられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD,

Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* (2008) 40, 1092- 1097

Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enoya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* (2008) 93, 3136-3141

Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* In press

学会発表：

鏑木康志、山下亮、井狩高平、郡司眸、浜田圭子、高橋枝里、平野久、安田

和基、野田光彦：初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析。第51回日本糖尿病学会年次学術集会，口演&ポスター発表，2008年5月、東京

高橋枝里、岡村匡史、井狩高平、平野久、安田和基、鏑木康志：LEA/Sendaiラット血清のプロテオーム解析。第51回日本糖尿病学会年次学術集会，口演&ポスター発表，2008年5月、東京

Eri Takahashi, Tadashi Okamura, Kohei Ikari, Hisashi Hirano, Kazuki Yasuda, Yasushi Kaburagi. Proteomic analysis of serum from diabetic LEA/Sendai rats. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis. August 2008, Sapporo

鏑木康志、井狩高平、山下亮、郡司眸、浜田圭子、高橋枝里、安田和基、野田光彦：初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析。日本ヒトプロテオーム機構第6回大会、2008年7月、大阪

鏑木康志。糖尿病におけるプロテオミクス研究の現状と今後の展望。第35回BMSコンファレンス，口演，2008年7月、裏磐梯

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

II. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

1. cICAT法での糖尿病患者血清解析データの多変量解析による検討

分担研究者 野田 光彦

国立国際医療センター戸山病院

糖尿病・代謝症候群診療部 部長

研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者由来臨床検体でのプロテオーム解析により、糖尿病関連蛋白のデータベース構築、新規バイオマーカー及び創薬ターゲットの発見に資することを目的とする。 【方法】前計画の「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において、本施設にて収集した糖尿病患者124例、健常者42例からの血清にてcICAT法を用いた定量解析を行い、多変量解析を用いた合併症予測を試みた。 【結果】合併症のない糖尿病患者では、健常者と比較して28個の蛋白が有意に変動していたが、1.5倍以上の変動を示す蛋白は認められなかった。糖尿病性合併症を有する患者血清では各合併症で異なる血清蛋白プロファイルが見られたが、いずれも変動の幅が小さかった。また、定量解析可能な蛋白の組み合わせについて、 k 近傍法を用いた糖尿病性合併症の有無の判別を試みて、比較的少数の蛋白の変動の組み合わせで糖尿病性合併症の有無を判別することがある程度可能であった。 【考察】cICAT法での少数例の解析で、糖尿病の病態によって血清蛋白プロファイルが異なることが示唆された。今後、cICATデータと臨床情報を組み合わせた上での多変量解析、多数の蛋白が定量可能なiTRAQ法を用いた多数の血清サンプルでの再解析が必要である。

A. 研究目的

糖尿病患者は2006年国民健康・栄養調査では約820万人といわれ、戦後一貫して増加している。糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を引き起こすことであり、網膜症では失明、腎症では腎不全による人工透析、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断に帰結し、国民健康上大きな問題になっている。これらの合併症は自覚症状を伴わないで進行するため、病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断するバイオマーカーの開発が急務である。国立国際医療センターは平成19年度までの「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に参加しており、その解析センター（プロテオームファクトリー）を利用した網羅的タンパク質解析を駆使して、糖尿病患者血清124例、健常者血清42例からcICAT法での定量解析を行い、各糖尿病性合併症で異なる血清蛋白プロファイルを認めた。

従来の研究において、糖尿病性細小血管症のバイオマーカーについては、例えば糖尿病性腎症を含む慢性腎疾患(CKD)では少数の既存のバイオマーカーのパネル化による病態管理が試みられているが、糖尿病性細小血管症で確立されたシングルマーカーはほとんどなく、単独あるいは複数のバイオマーカーの組み合わせでの病態評価は困難な段階にある。そこで本研究では、今回得られた健常者及び糖

尿病患者血清のcICAT解析で得られた蛋白プロファイルを多変量解析することによって、糖尿病性細小血管症の出現を予測可能かについて検討した。

B. 研究方法

・糖尿病患者血清及び臨床情報の収集及びcICAT法での解析

今回の「創薬基盤推進研究事業」の前に行われた「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において、我々は国立国際医療センターに通院する糖尿病患者（124例）及び健常者（42例）から臨床情報を収集すると共に、糖尿病関連蛋白のデータベース構築のために血清を採取した。血清は創薬プロテオームファクトリー施設にて高発現蛋白除去カラムにて処理後に、同施設のLC-MS/MSを用いたcICAT法にて糖尿病に関連した蛋白の同定、相対定量を行った。今回の解析について、定量された蛋白の変動パターンから糖尿病性合併症の有無を多変量解析にて判定するために、主成分分析で傾向の異なる蛋白をグループ分けし、t検定で有意な変動を示す蛋白を選別した。さらに選別された蛋白の組み合わせにて、*k*近傍法を用いて、糖尿病性合併症の有無の判別を試みた。

C. 研究結果

・糖尿病患者血清及び臨床情報

「疾患関連たんぱく質解析研究事業」

において、糖尿病診断マーカーの解析に使用するために収集した血清サンプルの中で、糖尿病患者88人、健常者42人を今回のcICAT法での解析に用いた（図1）。

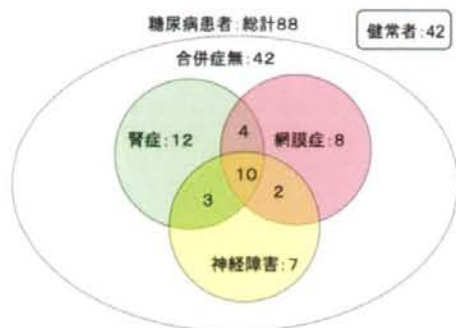


図1. cICAT法で解析した糖尿病患者の分類

・cICAT法での糖尿病患者血清の解析

創薬プロテオームファクトリー施設にて、上記の糖尿病患者及び健常者由来血清を用いてcICAT法による高発現血清蛋白の定量解析を行った。その結果、血清中の高発現蛋白63種類について定量情報が得られた（図2）。これらの蛋白の1/3は補体関係の蛋白であり、1/6は凝固関係、残りの半分弱は脂質代謝、細胞接着、輸送等に関与する蛋白やその他の蛋白で構成されていたが、これらの蛋白の中で、糖尿病患者血清にて健常者と比較して50%以上変動する蛋白は認められなかった。

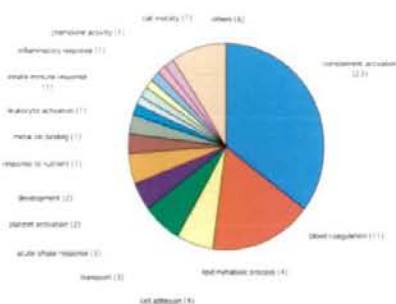


図2. cICAT法により定量された血清蛋白（総計63種類）の内訳

健常者と、合併症のない糖尿病患者及び各糖尿病性合併症の単独合併患者の比較では、各合併症にて血清蛋白プロファイルは異なるパターンを呈するものの、各合併症で固有な変動を示す蛋白は認められず、また合併症のない糖尿病患者においても30個の蛋白が有意に変動していた（図3）。

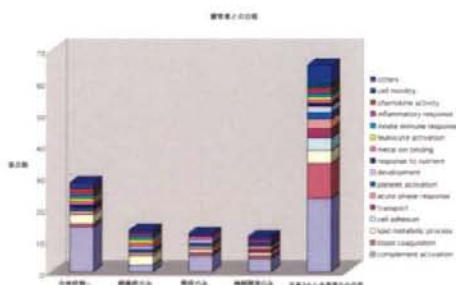


図3. 健常者と糖尿病患者の血清蛋白プロファイルの比較

糖尿病性合併症のない糖尿病患者と糖尿病性合併症を有する患者の比較では、腎症のみで6個、網膜症のみで6個、神経障害のみで15個の蛋白が有意に変動しており、その一部は各合併症間で重複していたが、いず

これらの蛋白も変動の幅が小さく、単独のメーカー候補になりうる蛋白は認められなかった(図4)。

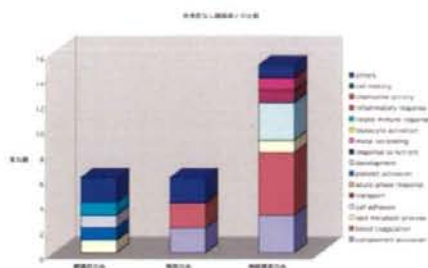


図4. 各合併症単独 vs 合併症なし糖尿病患者での血清蛋白プロファイルの比較

我々は加齢による血清蛋白プロファイルへの影響についても検討するために、健康者、合併症のない糖尿病の各群で年齢層別の比較を行ったが、有意に変動した蛋白は各群にて異なることから、糖尿病で変化している蛋白は単に加齢によって変動する蛋白ではなく、糖尿病に関連した変動であることが示唆された(図5)。

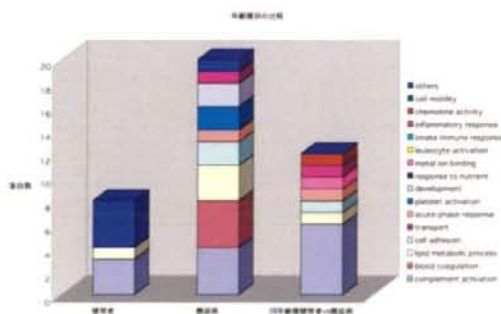


図5. 健康者、糖尿病患者での年齢層別比較及び同年齢層での健康者 vs 糖尿病患者での比較

我々は今回の解析データを用いて、定量された蛋白の変動パターンから糖尿病性合併症の有無を多変量解析にて判定することを試みた。具体的には、主成分分析で傾向の異なる蛋白をグループ分けし、t検定で有意な変動を示す蛋白を選別した。さらに選別された蛋白の組み合わせにて、k近傍法を用いて、糖尿病性合併症の有無の判別を試みた。その結果、比較的少数の蛋白の変動を組み合わせることによって、糖尿病性合併症の有無を判別することがある程度可能であった(表1)。

True Groups	Classified Groups	
	健康者+糖尿病・合併症なし	糖尿病患者・合併症あり
健康者+糖尿病・合併症なし	10 (62.5%)	6 (37.5%)
糖尿病患者・合併症あり	2 (9.5%)	19 (90.5%)

表1. k近傍法での血清蛋白5種類からの糖尿病性合併症の判別結果

D. 考察

前計画の「疾患関連たんぱく質解析研究事業」にて、当施設から創薬プロテオームファクトリー施設に発送した糖尿病患者血清及び健康者血清を用いたcICAT法による解析の結果から、糖尿病及び糖尿病性細小血管症に関連して変動する一群の蛋白を同定することができた。これらの蛋白で1.5倍以上の変動をしていた蛋白はなく、特定の病態を単独で診断可能なバイオ

マーカー候補は発見できなかった。今後の検討では、血清蛋白の網羅的定量解析の結果と臨床情報を多変量解析等の手法で検討することによって、疾患あるいは病態に固有な蛋白プロファイルのパターンを検索していく。

E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、糖尿病患者由来検体の網羅的同定を行い、病態に関連した蛋白を検索することは、新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発のために意義のある試みと考える。今回の解析では、比較的少数の糖尿病患者由来血清及び尿の解析によって、糖尿病及び合併症によって有意に変動する蛋白を多数同定することができた。今回の研究計画では、解析する検体数の増加、より多数の蛋白の定量が可能な iTRAQ 法に解析法を変更、検体収集する際に糖尿病性合併症及び大血管症について客観的情報との組織的な取得、得られた蛋白プロファイルと臨床情報からの多変量解析による多面

的解析等が挙げられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park K S, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* (2008) 40, 1092-1097

Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M. Replication

of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. J Clin Endocrinol Metab. (2008) 93, 3136-3141

Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. J Mass Spectrom Soc Jpn. In press

学会発表：

楠木康志. 糖尿病におけるプロテオミクス研究の現状と今後の展望. 第35回BMSコンファレンス, 口演, 2008年7月、
裏磐梯

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

I. 研究協力者：

加藤昌之（国際協力医学研究振興財団 主任研究員）

3. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析

分担研究者 鏑木 康志

国立国際医療センター・研究所・代謝疾患研究部
病態代謝研究室 室長

研究要旨

【目的】糖尿病性腎症の早期尿マーカーを検索するために、糖尿病患者由来尿蛋白を二次元電気泳動及び質量分析器にて解析した。

【方法】健常者、微量アルブミン尿のない、あるいは有する糖尿病患者の尿からアルブミン、IgGを除去後に2D-DIGE法を用いた二次元電気泳動を行い、有意に変動した蛋白スポットを酵素消化後にLC-MS/MSにて解析し、蛋白を同定した。【成績】健常者と微量アルブミン尿を有する糖尿病患者の尿蛋白を二次元電気泳動し、有意に変動する300個以上の蛋白スポットからLC-MS/MS解析にて、33個の蛋白（増加24個、減少9個）を同定した。この中には、既に報告されているTransferrin, Ceruloplasminの増加が認められた。

【結論】今回同定された尿蛋白は糖尿病性腎症の新たな診断マーカー候補となる可能性がある。

A. 研究目的

最近、糖尿病性腎症から腎不全となって透析導入となる患者は増加傾向にあり、透析導入の原因疾患の中で45%と第一位を占めている。糖尿病性腎症の治療においては、腎機能障害の軽度の段階で治療を開始しなければ、腎機能不全が治療の有無に関わらず進行するが、自覚症状が全くないために治療可能な時期を逸することが多い。糖尿病性腎症の診断には尿検査が重要であるが、一般的な尿検査で蛋白尿が出た時に

は腎機能障害が既に進行しており、完治することは不可能である。最近、尿中の微量アルブミンを測定して、初期腎症を診断する検査が行われるようになったが、現時点では糖尿病性腎症による腎不全を減少させるまでは至っていない。また、微量アルブミン尿は動脈硬化性疾患との関連性が指摘されており、糖尿病性腎症の特異的なマーカーであるかは明らかではない (Deckert et al. Diabetes Care (1992) 15, 1181-1191)。糖尿病性腎症の微量アルブミ

ン以外の尿マーカーとしては、IV型コラーゲンが既に臨床の現場で使われ出しているが、腎症の早期診断マーカーとしての意義は未だ十分には確立していない。

近年、質量分析計等の分析機器の進歩によって、生体試料のような多種類の蛋白の混合物であるサンプルから微量蛋白を検出して同定することが可能となった。このプロテオーム解析の技術を用いて様々な疾患の患者から採取した血清、組織等の臨床検体を試料として、その中に含まれる蛋白を網羅的に同定することによって、疾患の病態の変動、治療に対する反応などの指標となるバイオマーカーの探索が盛んに行われている。ところが、尿は採取が非常に容易なもの、塩濃度が高く蛋白濃度が低いこと、様々な塩以外の不純物を含むことから、プロテオーム解析は困難であり、実際に糖尿病性腎症での過去の報告でも、二次元電気泳動 (Sharma et al. Proteomics (2005) 5, 2648-2655; Rao et al. Diabetes Care (2007) 30, 629-637)、SELDI-TOF (Dihazi et al. Clin Chem (2007) 53, 1645-1653)を用いた少数の蛋白の検出・同定しか行われていない。

我々は、既に尿蛋白について限外濾過による濃縮、尿蛋白の大部分を占めるアルブミン等の蛋白除去等を組み合わせた前処理したサンプルを二次元電気泳動 (2D DIGE) 及び質量分析計で分析することによって、2000個前後の蛋白を比

較解析する系を確立している。この解析系を用いて、現時点で早期腎症として診断可能な微量アルブミン尿を有する第二期より早い段階の尿中の蛋白を多角的な視野から網羅的解析することによって、微量アルブミンより有用な糖尿病性腎症の早期マーカーを探索した。

B. 研究方法

健常者8名、微量アルブミン尿のない糖尿病患者16名、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者16名から随時尿を採取した (表1)。微量アルブミン尿の判定は尿アルブミン/クレアチニン比20 mg/g Crを閾値として判定した。採取した尿を限外ろ過にて濃縮し、Albumin and IgG Removal Kit (GE)にてアルブミン、IgGを除去後のサンプルをCyDyeにてラベルし、尿蛋白プロファイルを2D-DIGE法にて解析した。

	Healthy control subjects (H)	Diabetics without microalbuminuria (DN-)	Diabetics with microalbuminuria (DN+)
Number	8	16	16
Age	57.50 ± 2.67	57.88 ± 3.52	58.06 ± 7.29
Male: Female	1:1	1:1	1:1
BMI	21.81 ± 2.94	24.91 ± 3.38	25.47 ± 3.86
Duration of diabetes (years)	—	10.25 ± 6.94	9.25 ± 7.33
Systolic Blood Pressure (mmHg)	126.5 ± 6.4	129.1 ± 9.9	131.8 ± 14.2
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	78.9 ± 9.2	77.6 ± 9.3	76.6 ± 12.9
Estimated GFR (MDRD-4)	103.88 ± 24.52	89.13 ± 18.09	86.10 ± 24.76
Urine albumin (mg/g Cr)	8.51 ± 3.68	11.77 ± 5.37	61.05 ± 33.96
HbA _{1c} (%)	—	7.44 ± 1.37	7.43 ± 1.02

表1. 解析に用いた糖尿病患者及び健常者対照群の臨床像

ゲルイメージの解析はDeCyderにより

行い、各群間で有意に変化したスポットからトリプシン消化後に抽出したペプチドをLC-MS/MSにて解析した。得られたMS/MSスペクトルデータをMASCOTにてデータベース検索し、蛋白を同定した。

C. 研究結果

糖尿病性腎症患者由来尿蛋白の解析について、尿の限外濾過にて濃縮後に高含有量蛋白の除去を行う前処理を行った後に、2D-DIGE法を用いたディファレンシャル解析にてゲル当たり約2000個の蛋白スポットを検出することが可能となった。この系を用いて、微量アルブミン尿のない糖尿病患者16名、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者16名、コントロールとして健常者8名からの尿蛋白から尿蛋白を精製し、2D-DIGE法にて解析した（図1, 図2）。



図1. 早期腎症にて対照群と比較して増加した尿タンパク質スポット



図2. 早期腎症にて対照群と比較して減少した尿タンパク質スポット

2D-DIGEでの結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿にて健常者由来尿と比較して有意に変動する蛋白スポットを増加227個、減少85個を認めた。微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿と微量アルブミン尿のない糖尿病患者由来尿の比較では、有意に増加する蛋白スポットは93個、減少は30個であった。また、微量アルブミン尿のない糖尿病患者由来尿と健常者由来尿の比較では、有意に増加する蛋白スポットは58個、減少は9個であった。

これらの有意に変動した蛋白スポットをゲル内消化後にLC-MS/MSにて解析した結果では、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者にて増加する24個の蛋白、減少する9個の蛋白を同定した（表2, 表3）。これらの蛋白の中では、既に糖尿病性腎症にて有意に変動することが報告されているTransferrin, Ceruloplasmin (Narita (2006) Diabetes Care)が確認され

た。

D. 考察

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、糖尿病患者由来検体の網羅的同定を行い、病態に関連した蛋白を検索することは、新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発のために意義のある試みと考える。今回の解析では、比較的少数の糖尿病患者由来血清及び尿の解析によって、糖尿病及び合併症によって有意に変動する蛋白を多数同定することができた。今後の改善点としては、解析する検体数の増加、より多数の蛋白の定量が可能なiTRAQ法に解析法を変更、検体収集する際に糖尿病性合併症及び大血管症について客観的情報として取得、得られた蛋白プロファイルと臨床情報からの多変量解析による多面的解析等が挙げられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Mol Cell Biochem.* 298, 83-92, 2007

Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M. Role of IRS and PHIP on Insulin-Induced Tyrosine Phosphorylation and Distribution of IRS Proteins. *Cell Struct Funct.* 32, 69-78, 2007

Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A. The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis.* 51, 1-8, 2007

学会発表：

鏑木 康志、山下 亮、安田 和基、野田
光彦. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白の
プロテオーム解析. 第 50 回日本糖尿病学会
年次学術集会, 口演, 仙台, 5 月, 2007

井狩高平、山下亮、郡司眸、浜田圭子、安
田和基、野田光彦、鏑木康志. 糖尿病性腎
症・早期尿マーカーの 2D DIGE による検索.
日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, ポ
スター発表, 東京, 7 月, 2007.

鏑木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカー
の 2D DIGE による検索. 第 7 回 Tokyo
Diabetes Seminar, 口演, 東京, 7 月, 2007.

井狩 高平、山下 亮、郡司 眸、浜田 圭
子、安田 和基、鏑木 康志. プロテオー
ム解析を用いた早期糖尿病性腎症・尿マ
ーカーの検索. 第 30 回日本分子生物学会・第
8 回日本生化学 合同大会, 口演&ポスタ
ー発表, 横浜, 12 月, 2007.

高橋 枝里、岡村 匡史、井狩 高平、平
野 久、安田 和基、鏑木 康志. LEA/Sendai
ラット血清のプロテオーム解析. 第 30 回
日本分子生物学会・第 8 回日本生化学 合
同大会, ポスター発表, 横浜, 12 月,
2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

該当事項なし

Spot No.	Protein Name(s)	Accession No.	MW	pI	Fold	Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score
107,	Ceruloplasmin [precursor]	CERU_HUMAN	122983	5.44	1.91	7	8%	214
136,					2.83	12	12%	303
147,					3.08	13	12%	316
197,					2	3	3%	69
& 203					2.11	4	4%	107
114,	Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	109870	5.31	2.07	6	7%	185
& 519					2.45	6	6%	169
190	Lysosomal alpha-glucosidase [precursor]	LYAG_HUMAN	106126	5.62	1.9	9	9%	237
448	Alfamin [precursor]	AFAM_HUMAN	76963	5.64	4.12	12	21%	283
494,	Serotransferrin [precursor]	TRFE_HUMAN	79280	6.81	6.02	19	24%	456
538,					5.77	26	36%	647
587,					6.77	38	47%	863
& 617					3.9	3	5%	154
543,					2.52	9	20%	239
586,	Alpha-1B-glycoprotein [precursor]	A1BG_HUMAN	54809	5.58	2.95	8	18%	205
& 594					3.63	6	12%	142
632					3.25	8	7%	166
633	Glutamyl aminopeptidase	AMPE_HUMAN	109717	5.62	3.43	5	6%	123
693	Serum albumin [precursor]	ALBU_HUMAN	71317	5.92	4.19	5	8%	122
759,	Alpha-1-antitrypsin [precursor]	A1AT_HUMAN	46878	5.37	2.71	10	21%	236
826,					3.98	10	27%	275
835,					1.73	4	7%	124
846,					4.91	9	24%	293
868,					4.53	13	29%	305
893,					3.45	6	19%	224
910,					2.79	5	17%	184
& 1042					2.32	8	21%	262
817,					1.96	15	32%	409
849,	Thyroxine-binding globulin [precursor]	THBG_HUMAN	46637	5.87	2.05	14	24%	415
& 869					3.16	13	26%	365
832	Antithrombin-III [precursor]	ANT3_HUMAN	53025	6.32	3.22	22	29%	530
1100,	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein [precursor]	A2GL_HUMAN	38382	6.45	2.5	5	12%	151
1136,					3.43	3	6%	74
1174,					3.82	6	17%	140
& 1286					2.78	2	6%	69
1138	Plasma alpha-L-fucosidase [precursor]	FUCO2_HUMAN	54368	5.78	3.14	3	8%	128
1156	N-acetylglucosamine-6-sulfatase [precursor]	GNS_HUMAN	62840	8.6	2.81	3	6%	117
1173	Complement C4-A [precursor] ^a	CO4A_HUMAN	194247	6.65	5.19	2	1%	109
1198,	Complement C4-B [precursor] ^a	CO4B_HUMAN	194212	6.73			1%	
1207,	Zinc-alpha-2-glycoprotein [precursor]	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	3.19	2	8%	99
1250,					3.82	5	18%	181
1343,					2.78	5	19%	119
1400,					2.95	7	21%	209
1445,					3.45	8	33%	173
1481,					3.2	7	26%	221
1573,					2.24	2	8%	63
1585,					4.81	5	21%	161
& 3030					3.75	4	17%	90
1329					Di-N-acetylchitobiose [precursor]	DIAC_HUMAN	44416	6.19
1420,	Haptoglobin [precursor]	HPT_HUMAN	45861	6.13	2.95	4	10%	134
& 1533					3.69	10	18%	201
1437	Serpin B13	SPB13_HUMAN	44305	5.48	5.87	6	16%	155
1827	Cathepsin Z [precursor]	CATZ_HUMAN	34530	6.7	1.81	7	20%	219
2237	Cathepsin D [precursor]	CATD_HUMAN	45037	6.1	2.7	2	7%	113
2285	Lysosomal protective protein [precursor]	PPGB_HUMAN	54944	4.89	2.11	9	16%	235
2467	Prostaglandin-H2 D-isomerase [precursor]	PTGDS_HUMAN	31243	7.66	1.8	3	5%	119
2811	Ganglioside GM2 activator [precursor]	SAPI_HUMAN	21281	5.17	1.71	2	17%	117
					2.14	2	11%	56

a) Protein identity was given as precursor form.

b) Protein group

表 2. 早期腎症にて健常者群と比較して有意に増加した尿蛋白スポットから同定された蛋白