

200909005A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 春日 雅人

平成22 (2010) 年 5月

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

糖尿病性細小血管症の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、失明、腎不全、下肢切断等の重篤な合併症を引き起こす。本計画では、糖尿病性細小血管症の早期マーカー探索を目的として、健常者500名及び糖尿病患者1000名から血清、尿を収集してプロテオーム解析を行う。過去の研究では解析対象以外の病態は無視して解析したのと異なり、本計画では糖尿病性細小血管症を含む詳細な臨床情報を収集し、同時に糖尿病性細小血管症関連蛋白を網羅的に検索することによって、糖尿病性細小血管症を特異的かつ早期に検出しうる診断マーカー開発を目的とする。本計画では今年度から本施設での検体収集を開始しており、さらに他の医療機関においても倫理委員会にて審査済みである。プロテオーム解析法としては、当初予定していたiTRAQ法と比較してMRM法の測定感度が優れていることから、MRM法を用いた解析を本計画の中心とすることに変更した。このため、今年度はMRM法による解析系を確立すると同時に、各種臓器由来の内皮細胞にて糖尿病性細小血管症関連蛋白のトランスクリプトーム解析を行い、MRM法で定量解析するマーカー候補を検索した。

糖尿病でのバイオマーカー探索研究の位置づけ

糖尿病は国内外で急増しており、国際糖尿病連合（IDF）の最新の発表によると世界の糖尿病有病数は2億8500万人と全人口の6.4%を占めている。また、世界の糖尿病患者は2030年には2010年の50%以上増の4億3800万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07年国民健康・栄養調査では糖尿病有病者は890万人といわれ、5年前の調査と比較しても20%以上増加しているが、これらの急増している患者のほとんどは2型糖尿病である。また、07年国民健康・栄養調査では、2型糖尿病と深い関連性のあるメタボリックシンドロームも予備軍を含めて2010万人と急増している。さらに、糖尿病罹患患者では腎症、網膜症、神経障害といった糖尿病に固有な細小血管症が出現し、2008年の統計では糖尿病性腎症が原因の透析導入患者数は年間1万6000人と透析導入原因疾患の40%以上と第1位を占め、糖尿病性網膜症からの失明患者は年間3000人と失明原因の2位、糖尿病性壊疽による下肢切断の原因となる糖尿病性神経障害も糖尿病患者の1/3以上と、糖尿病性細小血管症による健康障害は国民健康上大きな問題

になっている。これらの糖尿病性細小血管症は重篤な合併症が進行するまで自覚症状を伴わないため、日常診療の現場で糖尿病性細小血管症の病期や予後・進行性などを的確にかつ簡便に診断可能な診断指標（バイオマーカー）が開発されれば、糖尿病合併症の予防、早期治療に有用であり、その意義は高い。

糖尿病の診療においては、既に血糖、HbA1cがそれぞれ糖尿病の診断、長期の血糖コントロールの指標となるバイオマーカーとして広く用いられている。これらのバイオマーカーと糖尿病性細小血管症の関連性については、過去の多くの大規模臨床研究によって糖尿病性細小血管症の発症及び進行が長期の血糖コントロールと強い関連性があることは既に明らかになっている。ところが、個々の患者において糖尿病性細小血管症の有無あるいは進行するか否かを判定する血清あるいは尿のバイオマーカーは現時点では存在しない。例えば、糖尿病性腎症では微量アルブミン尿が腎症の病期の判定に使われており、微量アルブミン尿を呈する場合は腎症第2期と診断される。ところが1型及び2型糖尿病のいずれにおいても6年間の追跡調査の結果では、微量アルブミン尿から正常化する患者が40-50%を占めており、微量アルブミン尿は糖

尿病性腎症のサロゲートエンドポイントとはなりえない(Perrin et al. *Kidney Int* 69:699, 2006; Araki et al. *Diabetes* 56:1727, 2007)。

このため、糖尿病性細小血管症の診断マーカーとなりうる蛋白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には意義がある。プロテオーム解析のための臨床サンプルとしては、糖尿病診療の現場で日常的に採取される血清あるいは血漿が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、同定されたバイオマーカー候補蛋白が糖尿病発症の原因となる臓器あるいは合併症の場となる組織に由来するか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の有無によっては糖尿病がなくても進行している可能性がある。それにも関わらず、過去の糖尿病の診断マーカー探索研究では、研究対象以外の病態は無視する形で解析を行ってきた。今後の糖尿病患者での細小血管症マーカー探索では、細小血管症はもちろんのこと、さらに糖尿病のバックグラウンドで進行する大血管症等の病態の評価が必須と考えられる。

本研究での解析法の変更について

平成20年度にスタートした「創薬バ

イオマーカー探索研究」の一環として行われている本研究計画では、糖尿病性細小血管症に着目し、糖尿病性細小血管症を含む詳細な臨床情報を収集すると共に、糖尿病性細小血管症に関連した蛋白あるいはペプチドを種々のプロテオーム解析法を用いて網羅的に検索する。これらの解析によって、糖尿病性細小血管症を特異的かつ早期に検出しうる血清及び尿マーカーを開発すること、細小血管障害を含めた糖尿病の多様な病態と血清及び尿蛋白プロファイルの関係性を多変量解析等の手法を用いて明らかにすることを目的としている。前研究計画の反省から、通院あるいは入院糖尿病患者を研究対象として、血清及び尿を採取すると共に糖尿病性細小血管症及び動脈硬化の進行度を含む詳細な臨床情報を収集している。プロテオーム解析に用いる手法としては、血清については前計画で用いられたiCAT法より多数の蛋白の定量解析が可能なiTRAQ法での解析を予定していたが、今年度に別予算にてMRM法による解析が可能な質量分析計が本施設に導入されたこと、MRM法の測定感度がiTRAQ法よりはるかに優れていることからMRM法を用いた血清及び尿タンパク解析を本計画の中心とすることに変更した。MRM法では、解析の対象となる蛋白が明らかになっている場合に、従

来の解析法では検出感度以下であったサイトカインと同程度の血中濃度 (ng/ml) の蛋白も含めた解析を行うことが可能である。また、尿蛋白については従来の解析法では尿を限外濾過にて濃縮する際に分子量10kDa以下は失われるため、最近使われるようになったキャピラリー電気泳動と質量分析器を組み合わせたシステムも用いた解析を行う。これらの解析法で同定された蛋白あるいはペプチド候補から、糖尿病性細小血管症のサリロゲートエンドポイントとなりうるバイオマーカーが開発されることに期待したい。

結論

糖尿病患者は急増しており、厚生労働省の2007年の国民健康・栄養調査では糖尿病有病者と糖尿病の可能性がある「予備軍」を合わせると約1870万人といわれ、4年前と比較しても15%以上増加している。さらに、糖尿病性腎症は透析導入の原因疾患の1位、糖尿病性網膜症は失明の原因の2位を占め、糖尿病性神経障害が進行しておこる糖尿病性壊疽による下肢切断も非外傷性下肢切断の1位となり、これらの糖尿病性細小血管症は国民健康及び医療経済上大きな問題になっている。ところが、糖尿病性細小血管症は自覚症状を伴わず発症して慢性長期に進展することが特徴であり、見かけの検査値だけでなく病期の変化の把握が

重要であるが、信頼すべき代謝マーカーが乏しい。本研究は、糖尿病性細小血管症に焦点を当て、日常診療の場で採取が容易な血清及び尿を試料として、早期の段階で診断可能なバイオマーカーを開発することを目標としている。微量蛋白も定量可能なMRM法を中心にして、再現性の高い定量法であるiTRAQ法、低分子量のペプチドも解析可能なキャピラリー電気泳動を含めて多角的な視点にてプロテオーム解析することによって、有用な糖尿病性細小血管症の早期診断マーカー候補を絞り込むことが可能であり、これらの検討により早期診断法が確立されれば糖尿病患者のQOL向上及び医療費節減のために有効な手段となりうる。

健康危険情報

該当事項なし

研究発表

論文：

Okamoto K, Iwasaki N, Nishimura C, Doi K, Noiri E, Nakamura S, Takizawa M, Ogata M, Fujimaki R, Grarup N, Pisinger C, Borch-Johnsen K, Lauritzen T, Sandbaek A, Hansen T, Yasuda K, Osawa H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M, Pedersen O, Fujita T, Kamatani N, Iwamoto Y, Tokunaga K. Identification of KCNJ15 as a suscepti

bility gene in Asian patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* (2010) 86, 54-64

Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MC, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, Ma RC, So WY, Chan JC, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *J Hum Genet.* (2009) 54, 236-241

Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* (2009) 57, 201-206

学会発表 :

Yasushi Kaburagi, Keiko Hamada, Eri Takahashi, Ayaka Honma and Kazuki Yasuda. Proteomic analysis of palmitoylated proteins in H

EK 293 cells using acyl-biotinyl exchange technology. 第32回日本分子生物学会、ポスター発表, 横浜, 12月, 2009.

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. トランスクリプトーム解析による糖尿病性腎症関連因子の探索—in vitro に よる細小血管症マーカー候補探索の試み—

鈴木 康志

国立国際医療センター (研究所)

臓器障害研究部長

研究要旨：

糖尿病では内皮細胞がポリオール代謝、糖化産物、酸化ストレス等の様々な分子機構により障害を受け、これが糖尿病性細小血管症と関連すると考えられている。本研究では、糖尿病性細小血管症に関連するバイオマーカー候補蛋白を探索する目的で、高ブドウ糖負荷により発現上昇する内皮細胞由来分泌蛋白をコードする遺伝子群を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。複数の分泌蛋白が同定され、そのうち、TFPI-2 は糖尿病性腎症を有する糖尿病患者の血清濃度が健常者および合併症のない糖尿病患者に比べて上昇していた。GDF-15 の血清濃度は、健常者<合併症のない糖尿病患者<糖尿病性腎症を有する糖尿病患者の順に高値を示した。これらの分泌蛋白は高ブドウ糖負荷により発現パターンが異なることから、これらの分泌蛋白が異なる臓器の糖尿病性細小血管症の診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

さらに糖尿病性腎症に関連するバイオマーカー候補蛋白を探索する目的で、高ブドウ糖負荷により腎糸球体内皮細胞で特異的に発現変動する遺伝子を他の部位由来の内皮細胞（大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、網膜血管内皮細胞）の発現と比較することにより解析した。このトランスクリプトーム解析によって、高ブドウ糖負荷によって腎糸球体内皮細胞でのみ発現変動する遺伝子群が複数同定された。糖尿病性細小血管症の発症・進展は内皮細胞障害と密接に関連することから、今回、腎糸球体内皮細胞で同定された遺伝子群の発現差異が糖尿病性腎症の発症・進展と関連する可能性が考えられる。今後、同定した遺伝子群の機能を in vitro, in vivo にて検討し糖尿病性腎症の発症との関連を明らかにすることにより、従来よりも効率的な糖尿病性腎症のマーカー蛋白の探索・評価が可能になると期待される。

A. はじめに

2007年度の糖尿病実態調査によると、わが国には予備軍まで含めて推定 2210 万人の糖尿病患者が存在し、今や成人の 5 人に 1 人が何らかの糖代謝の異常を持つと推定されている。これに伴い、慢性的な高血糖により引き起こされる大小血管合併症を抱えた患者数も激増の一途を辿っている。近年、Diabetes control and complication trial (DCCT) や United Kingdom Prospective diabetes study (UKPDS) などの大規模臨床研究により、厳格に血糖や血圧をコントロールすることで糖尿病細小血管症の発症、進展を抑制できることが報告された。しかしながら、さまざまなインスリン製剤や経口血糖降下剤の使用が可能となった今日においても、血糖の完全な正常化には困難を要し、血管合併症を抱えた糖尿病患者の生命予後は必ずしも改善されていない。

糖尿病の特徴は、インスリンの分泌障害や標的臓器における作用不全によって慢性の高血糖が引き起こされる代謝疾患群である。しかしながら、糖尿病の特徴は自覚症状を伴わずに進行する糖尿病性細小血管症にあるともいえ、患者の QOL と生命予後に大きく影響する。事実、糖尿病患者の約 40-50%の方々が心筋梗塞や脳血管障害などの心血管系の疾患が原因で死亡したり、寝たきりや認知症に陥っている。さらに糖尿病では、健康で若々しく過ごせる寿命が男女とも約 15 年短いことが報告されている。これらの事実は糖尿病においては、血管合併症の進展を防ぎ、心血管イベントの発症を予防していくことが治療戦略上最も重要

な課題であることを示している。

・血管内皮細胞と糖代謝

血管内腔の表面に存在する一層の細胞である内皮細胞は血管内腔のバリア機能および血流を保持するための抗血栓、抗凝固機能に働く静的な細胞と永らく考えられてきた。しかしながら、近年になって多様なホルモン、サイトカイン、血管作動物質が血管内皮細胞より分泌されることが明らかにされ、血管の緊張、透過性を調節するのみならず組織の炎症反応、血管新生、免疫反応など様々な機能を制御する極めて活発な機能を発揮する細胞であることが分かってきた。したがって、内分泌機能をもつ他の細胞同様、血管内皮細胞もブドウ糖の取り込みをはじめとするエネルギー代謝が極めて活発である。

血管内皮細胞は主としてインスリン非反応性の 1 型糖輸送担体とインスリン反応性の 4 型糖輸送担体によりブドウ糖取り込みを行っていると考えられる。高血糖状態では内皮細胞への糖取り込みが増加し、細胞内糖代謝異常(糖毒性)を引き起こし、その結果、内皮細胞の様々な機能障害や遺伝子発現異常を誘導すると考えられている。それらの異常が細胞内糖代謝異常によって誘導される機構としてこれまで、PKC の異常活性化、終末糖化産物の作用、酸化ストレスに基づく蛋白変性と NF- κ B, AP-1 などのレドックス感受性転写因子の異常活性化、グルコサミン代謝亢進による遺伝子発現調節異常などが示唆されている。さらに、最近の報告ではこれらの異常が互いに関連しあうことが明らかにされてきている。なかでも内皮細胞障害を直接もたらす機構として

は、活性酸素に代表される酸化ストレスの亢進が高血糖に関連する様々な代謝障害から誘導される機構が明らかにされつつある。

・高血糖と酸化ストレス

高血糖状態が血管内皮細胞での活性酸素の産生を高め、酸化ストレスを亢進させることが知られている。ミトコンドリアは電子伝達の過程で絶えず活性酸素を産生しており、糖尿病血管合併症での酸化ストレスの重要性が明らかになってきたことから、高血糖による活性酸素の産生源として注目されている。実験動物においてはミトコンドリア DNA の酸化変性、欠失、塩基置換などが糖尿病状態で増加し、培養内皮細胞を用いた検討では高ブドウ糖濃度条件下でミトコンドリアでの活性酸素産生が高まることが報告されている (Nature 404: 787-790, 2000)。活性酸素産生の亢進にはミトコンドリア電子伝達系の複合体 II が関与し、この阻害剤によってミトコンドリアからの活性酸素産生を抑制すると、高血糖に伴う PKC 活性の上昇、転写因子 NF- κ B の活性化、AGE 産生の抑制が引き起こされた。またミトコ

C. 研究方法

・細胞培養と細胞内活性酸素種 (ROS) の測定

ヒト初代培養血管内皮細胞 (腎系球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、網膜血管内皮細胞) (DS ファーマバイオメディカル、大阪) の培養は 10% ウシ胎仔血清含有培地で培養した。培養血管内皮細胞を 60mm コラーゲン I コートディッシュ (IWAKI) に播種し、正常ブドウ糖濃度培地 (5 mM) または高ブドウ糖濃度培地 (30 mM) にて 37°C、5%

ンドリアでの活性酸素はヘキサミン経路を活性化し、転写因子 Sp1 の活性を上昇させ PAI-1 や TGF- β の発現増加とも関連している。

B. 研究目的

糖尿病では内皮細胞がポリオール代謝、糖化産物、酸化ストレス等の様々な分子機構により障害を受け、これが糖尿病性細小血管症と関連すると考えられている。したがって、内皮細胞障害の機序を解明することにより糖尿病性細小血管症の病態を考える上で多くの示唆が得られる可能性がある。そこで本研究では、糖尿病性細小血管症に関連するバイオマーカー候補蛋白を探索する目的で、高ブドウ糖負荷により発現上昇する内皮細胞由来分泌蛋白をコードする遺伝子群を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。さらに糖尿病性腎症に関連するバイオマーカー候補蛋白を探索する目的で、高ブドウ糖負荷により腎系球体内皮細胞で特異的に発現変動する遺伝子を他の部位由来の内皮細胞の発現と比較することにより検討した。

炭酸ガス中で数日間培養した。

0.05% trypsin+0.02% EDTA 溶液にて培養血管内皮細胞を遊離後、200 mM 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を添加した培地 1 ml に懸濁し、37°C、30 分間インキュベーションした。DCFDA は細胞透過性を有する活性酸素種の指示物質であり、細胞内エステラーゼによってアセテート基が外され、細胞内で酸化が生じて初めて蛍光を発する。細胞を遠心分離により洗浄後、5% FBS を含む PBS に

再懸濁シフローサイトメーター (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF) の蛍光強度を測定した。DCF 蛍光強度の平均値は CellQuest Pro ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて算出した。

・遺伝子発現解析

RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、培養内皮細胞からトータル RNA の抽出を行った。RNA の品質を Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いて評価したうえでマイクロアレイ解析に用いた。夾雑物である DNA は RNase-free DNase (Qiagen) を用いて除去した。

全量 RNA のうち 2 μ g を用い、one-cycle target labeling and control reagents kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて cRNA を合成した。Human Genome-U133 Plus 2.0 マイクロアレイ (Affymetrix) のハイブリダイゼーションおよびシグナル検出は Affymetrix 社標準プロトコールにしたがって実施した。

・データのノーマライズおよび遺伝子の選択

MicroArray Suite 5.0 (MAS5) Human Genome-U133 Plus 2.0 の 54,613 プローブセットの発現強度に対して、培養内皮細胞を「高ブドウ糖濃度培地にて処理した群」(n=3) と「正常ブドウ糖濃度培地にて処理した群」(n=3) の 2 群における幾何平均値の倍差である fold-change (FC) を求めた。その後、FC が 2 群間で 2 倍以上 (FC>2 または FC<0.5) となり信頼度指標 (Detection p-value) が $p<0.05$ となるプローブセットを抽出した。

選択された遺伝子のうち、「分泌蛋白」、「shedding を受ける蛋白」、「膜蛋白」、「細胞外蛋白」に関する機能カテゴリーに属する遺伝子群をヒト初代培養内皮細胞由来分泌蛋白をコードする遺伝子群として抽出した。

腎系球体内皮細胞で特異的に発現変動する遺伝子群の抽出に際しては、選択された遺伝子を用いて k-means 法により階層的クラスタリングを行った。クラスタリングには Cluster 3.0 ソフトウェアを用い、分割クラスタ数以外の設定は類似尺度を correlation (uncentered)、繰り返し計算回数を 1000 にした。

・リアルタイム PCR 解析

ヒト初代培養血管内皮細胞からの total RNA 抽出は Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Germany) を用いて行った。腎系球体内皮細胞特異的発現変動遺伝子の mRNA 発現量は StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems LLC, Foster City CA, USA) を用いたリアルタイム PCR 法で求め、GAPDH mRNA 量で標準化した。

・統計解析

各々の実験は 3 回実施し、結果は平均値 ± 標準偏差で表記した。2 群間の有意差検定には Student's t-検定を使用した。3 群間以上の有意差検定には分散分析およびポストホックテストとして Scheffe 法を使用し、有意水準は 5% とした。

D. 研究結果

・細胞内 ROS の測定

ヒト網膜血管内皮細胞を正常ブドウ糖濃度培地 (5 mM) または高ブドウ糖濃度培地 (30 mM) にて 5 日間、あるいは 7 日間培養

後、細胞内 ROS 産生量を測定した。正常ブドウ糖環境下では 5 日目、7 日目における細胞内 ROS 産生量に有意な差は認められなかった。高ブドウ糖環境下で 5 日間以上培養すると、正常ブドウ糖環境下に比べて細胞内 ROS 産生量が有意に上昇した (図 1)。同様に腎系球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞を用いて高ブドウ糖環境下での ROS 産生量

を測定した。腎系球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞では 6 日間、臍帯静脈内皮細胞では 5 日間、高ブドウ糖環境下で培養すると正常ブドウ糖環境下に比べて細胞内 ROS 産生量が有意に上昇した。以下に示すマイクロアレイ解析に用いた各種内皮細胞由来 RNA はすべて、ROS 産生量に有意差のある培養条件下で回収した内皮細胞から調製したものをを用いた。

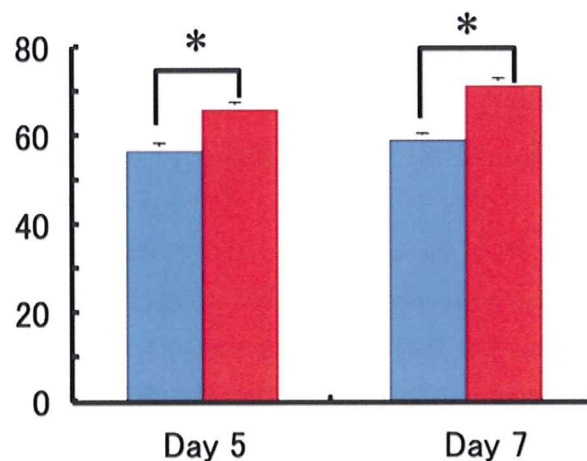


図 1 ヒト網膜内皮細胞における高ブドウ糖環境下での細胞内 ROS 産生量。培養ヒト網膜内皮細胞を正常ブドウ糖濃度培地 (5 mM) または高ブドウ糖濃度培地 (30 mM) にて 5 日間、あるいは 7 日間培養後、H₂DCFDA を用いて細胞内 ROS 産生量を測定した。Trypsin/EDTA 溶液にて培養血管内皮細胞を遊離後、200 mM 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H₂DCFDA) と 37°C、30 分間インキュベーションし、フローサイトメーター (FACSCalibur) を用いて 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) の蛍光強度を測定した。独立した 3 回の実験での平均値 ± 標準偏差でデータを表した。(*p<0.05; n=3)。■ : 正常ブドウ糖濃度培地 (5 mM)、■ : 高ブドウ糖濃度培地 (30 mM)。

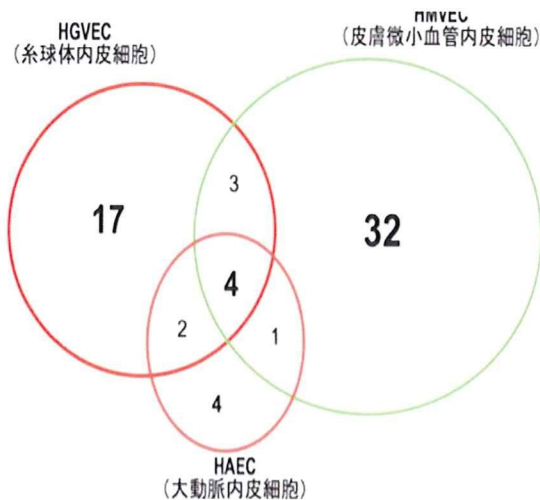


図2 腎系球体内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、大動脈内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現上昇した分泌蛋白コード遺伝子の数

・高ブドウ糖負荷により発現上昇する内皮細胞由来分泌蛋白の探索

腎系球体内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、大動脈内皮細胞について、高ブドウ糖負荷時に発現上昇する分泌蛋白遺伝子数の関係図を図2に、各細胞における分泌蛋白遺伝子リストを表1～3に示す。腎系球体内皮細胞と皮膚微小血管内皮細胞の比較では、両者で共通な分泌蛋白は7個にすぎず、腎系球体内皮の17個、皮膚微小血管内皮の32個の分泌蛋白は高ブドウ糖負荷にて異なる変動パターンを示した。次に、糖尿病による細小血管障害が起こる腎系球体内皮細胞において、高ブドウ糖負荷で発現上昇する分泌蛋白の中から大動脈内皮や皮膚微小血管内皮では変動しない17個の分泌蛋白に着目した。これらの蛋白の中で、TFPI-2は血管内皮細胞特異的に発現することが知られている。また、GDF-15は腎疾患関連蛋白として知られる蛋白と同じファミリーに

属している。そこで、これらの2つのTFPI-2およびGDF-15について、健常者2名、合併症のない糖尿病患者2名、糖尿病性腎症を有する糖尿病患者2名からの血清を試料としてWestern blottingにより検証を行った(図3)。TFPI-2については、健常者及び合併症のない糖尿病患者の血清濃度は同程度だが、糖尿病性腎症を有する糖尿病患者では血清濃度が前2者と比較して上昇していた。GDF-15については、糖尿病性腎症を有する糖尿病患者では健常者と比較して血清濃度が上昇しており、合併症のない糖尿病患者では健常者と糖尿病性腎症を有する糖尿病患者との間の中間程度の濃度を示した。最後に、腎系球体内皮細胞、網膜血管内皮細胞、大動脈内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現上昇した分泌蛋白遺伝子数の関係を図4に、網膜血管内皮細胞における分泌蛋白遺伝子リストを表4に示す。

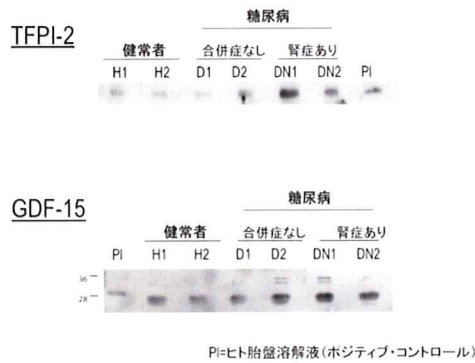


図3 糖尿病患者血清での Western blotting によるマーカー候補蛋白の検証

腎糸球体内皮及び網膜血管内皮はいずれも糖尿病にて細小血管障害を受けるが、特に網膜血管内皮のみにて発現上昇する分泌蛋白が 99 個と多数検出された。図 3 にて検

証した TFPI-2 は腎糸球体内皮細胞のみで発現上昇し、GDF-15 は腎糸球体内皮細胞と網膜血管内皮細胞の両細胞で発現上昇していた。

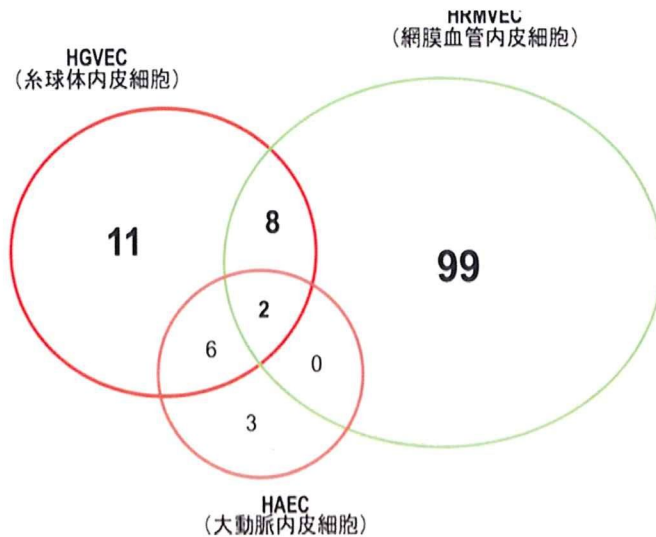


図4 腎糸球体内皮細胞、網膜血管内皮細胞、大動脈内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現上昇した分泌蛋白コード遺伝子の数

・腎糸球体内皮細胞特異的発現変動遺伝子の抽出

ヒト初代培養血管内皮細胞（腎糸球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、網膜血管内皮細胞）を用いて行ったマイクロアレイ解析により、高ブドウ糖処理群と正常ブドウ糖濃度処理群で差のあった遺伝子の同定を行った。その結果、54,613プローブセットのうち、腎糸球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、網膜血管内皮細胞のいずれかで $FC > 1.5$ となる 12109 プローブセットを発現差のある遺伝子群として抽出した。12109 プローブセットに対して、分割クラスタ数を 10、15、20 の 3 パターンに設定したクラスタリングの結果を図 5 に示す。10 分割クラスタでは、腎糸球体内皮細胞のみで高ブドウ糖処理により発現上昇する遺伝子群がクラスタ 7 に、

腎糸球体内皮細胞のみで高ブドウ糖処理により発現低下する遺伝子群がクラスタ 2 に抽出された。15 分割クラスタ、20 分割クラスタでも腎糸球体内皮細胞でのみ発現変動する類似の 2 クラスタが出現したが、分割クラスタを 20 よりも多く設定すると類似パターンのクラスタが複数出現したため、分割クラスタ数は 20 クラスタ程度までが適正と判断した。20 分割クラスタにおいて、クラスタ 10 を HGVEC でのみ発現上昇する遺伝子群として抽出した。クラスタ 10 には 283 プローブセットが抽出され、このうち FC が 2 倍以上となる遺伝子数は 46 であった（表 5）。同様に HGVEC でのみ発現低下する遺伝子群としてクラスタ 8 を抽出した。クラスタ 8 には 341 プローブセットが抽出され、このうち FC が $1/2$ 以下となる遺伝子数は 32 であった（表 6）。

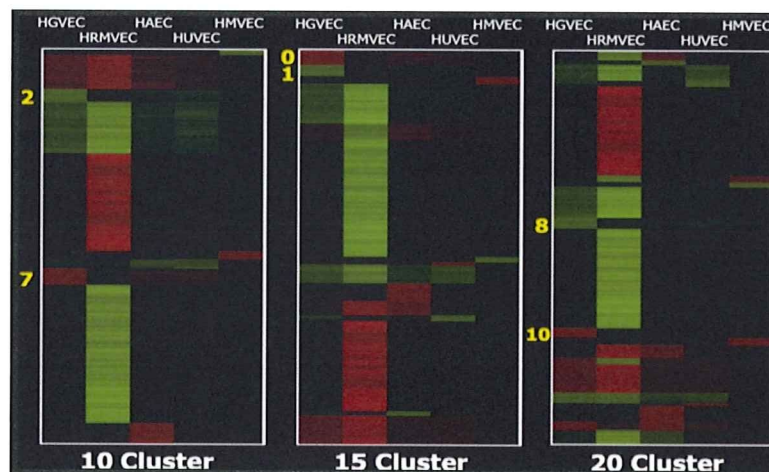


図 5 腎糸球体内皮細胞特異的発現変動遺伝子の抽出。ヒト初代培養血管内皮細胞（腎糸球体内皮細胞(HGVEC)、網膜血管内皮細胞(HRMVEC)、大動脈内皮細胞(HAEC)、臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、皮膚微小血管内皮細胞(HMVEC)) に対する高ブドウ糖処理と正常ブドウ糖濃度処理の 2 群における遺伝子発現量の差について統計的検定を行い、fold-change (FC) > 1.5 となる 12109 プローブセットを抽出した。12109 プローブセットに関して、Cluster 3.0 ソフトウェアを用いて分割クラスタ数を 10, 15, 20 に設定し階層的クラスタリングを行った。

・Functional Annotation Toolによる解析
一般に糖尿病状態では、慢性高血糖の結果、全身の多くの組織・臓器でグリケーションが誘導され、Maillard反応の過程で産生される活性酸素などが組織障害をもたらし、糖尿病合併症の進展に寄与する。我々はマイクロアレイの特性を活かすため、高ブドウ糖濃度によるメカニズムに拘ることなく全体的な視点から解析を始めた。マイクロアレイを用いる実験では膨大な遺伝子発現変化を基に複数の生体応答を一度に捉えることができる反面、まずどのような変化に着目して解析すればよいのかという方向性決定には難点も多い。我々はまずバイアスの無い機械的な解析によって高ブドウ糖濃度処理によって最も変動した遺伝子グループを抽出する目的で DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) の遺伝子機能分類を適用した。これは共起性に基づき最も変動の多い遺伝子を含む機能カテゴリーを発見するための WEB ツールであり、解析対象をフォーカスするのに有効である。解析の結果、表 7～8 に示すように HGVEC で特異的に発現上昇する遺伝子群 (表 7)、発現減少する遺伝子群 (表 8) について有意な機能カテゴリーが得られた (Fisher's exact p-value: $p < 0.05$)。まず HGVEC で特異的に発現上昇する遺伝子群においては biological rhythms や rhythmic process に関する機能カテゴリーが変動している様子が伺え、変動遺伝子の比率の大きさを表す enrichment score は 2.4 となった。これらの機能カテゴリーに関連づけられた遺伝子は ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1 (FC=2.90), period homolog 1

(Drosophila) (FC=2.56), period homolog 3 (Drosophila) (FC=2.33), B-cell CLL/lymphoma 2 (FC=4.21) であった。次いで変動遺伝子の比率が大きいのは Cell morphogenesis, cell component morphogenesis に関する機能カテゴリーであり、enrichment score は 1.25 となった。これらの機能カテゴリーに関連づけられた遺伝子は tubulin tyrosine ligase-like family, member 3; actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa (FC=3.00), nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (FC=2.96), laminin, alpha 1 (FC=2.88), B-cell CLL/lymphoma 2 (FC=4.21) であった。

一方、HGVEC で特異的に発現低下する遺伝子群においては Intracellular protein transport, cellular protein localization など 8 つの機能カテゴリーが変動する割合が高く、functional annotation cluster における enrichment score は 1.93 となった。これらの機能カテゴリーに関連づけられた遺伝子は RAN binding protein 17 (FC=0.21), RPA interacting protein (FC=0.25), brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator) (FC=0.28), catenin (cadherin-associated protein), delta 1 (FC=0.50), dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 (FC=0.45), neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4 (FC=0.26), syntaxin binding protein 4 (FC=0.22) などであった。

・腎系球体内皮細胞特異的発現変動遺伝子

のmRNA発現量解析

DNAマイクロアレイ解析により同定された腎糸球体内皮細胞特異的変動遺伝子群のうち、syntaxin binding protein 4 (STXBP4), insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), interleukin 7 receptor (IL7R), thrombomodulin (THBD) の4遺伝子について、高ブドウ糖処理による腎糸球体内皮細胞での発現変動を用いてリアルタイムPCR法により検証した結果を図6に示す。STXBP4発現量は正常ブドウ糖処理では 1.22 ± 0.25 (A.U) に対し、高ブドウ糖処理によりその発現が 0.76 ± 0.15 と有意

に低下し、DNAマイクロアレイ解析の結果と一致した。また、IGFBP5発現量 (正常ブドウ糖処理： 1.05 ± 0.04 、高ブドウ糖処理： 6.72 ± 1.10)、THBD発現量 (正常ブドウ糖処理： 0.93 ± 0.06 、高ブドウ糖処理： 1.58 ± 0.13) は高ブドウ糖処理により有意に上昇し、これらの結果もDNAマイクロアレイ解析の結果と一致した。一方、IL7R発現量については、正常ブドウ糖処理で 1.11 ± 0.16 、高ブドウ糖処理で 1.06 ± 0.16 となり、両者間に有意な発現差は認められなかった ($p=0.74$)。

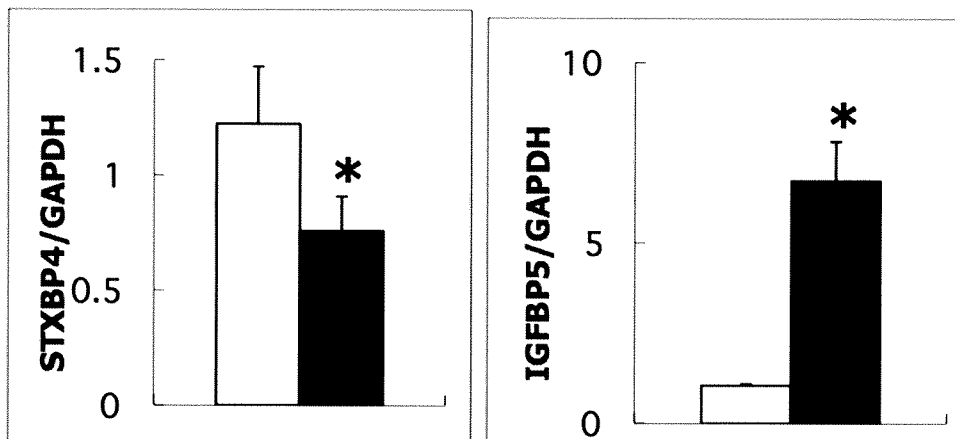


図6 腎糸球体内皮細胞特異的発現変動遺伝子のリアルタイム PCR 解析による検証。培養ヒト腎糸球体内皮細胞を正常ブドウ糖濃度培地 (5 mM) または高ブドウ糖濃度培地 (30 mM) にて5日間培養後 total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて STXBP4, IGFBP5, IL7R, THBD 遺伝子発現量を測定した。各測定値は GAPDH mRNA 量で標準化し、結果は平均値±標準偏差で表記した。*: $p < 0.05$ 。

E. まとめ

今回、ヒト初代培養血管内皮細胞を用いたトランスクリプトーム解析によって、高ブドウ糖負荷によって発現上昇する複数の分泌蛋白が検出された。そのうち、TFPI-2 は糖尿病性腎症を有する糖尿病患者の血清濃度が健常者および合併症のない糖尿病患

者に比べて上昇していた。GDF-15 の血清濃度は、健常者<合併症のない糖尿病患者<糖尿病性腎症を有する糖尿病患者の順に高値を示した。これらの分泌蛋白は高ブドウ糖負荷により発現パターンが異なることから、これらの分泌蛋白が異なる臓器の糖尿病性細小血管症の診断マーカーとなりうる

可能性が考えられる。

一方、ヒト初代培養血管内皮細胞（腎糸球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、網膜血管内皮細胞）を用いた血管内皮細胞でのトランスクリプトーム解析によって、高ブドウ糖負荷によって腎糸球体内皮細胞でのみ発現変動する遺伝子群が同定された。高ブドウ糖負荷による遺伝子発現変動パターンは内皮細胞の採取部位により多様性があり、共通の遺伝子発現制御機構を有する遺伝子群がある一方で各種内皮細胞に特異的な遺伝子発現制御機構が存在することが推察される。糖尿病性細小血管症の発症・進展は内皮細胞障害と密接に関連することから、今回、腎糸球体内皮細胞で同定された遺伝子群の発現差異が糖尿病性腎症の発症・進展と関連する可能性が考えられる。今後、

同定した遺伝子群の機能を *in vitro*, *in vivo* にて検討し糖尿病性腎症の発症との関連を明らかにすることにより、従来よりも効率的な糖尿病性腎症のマーカー蛋白の探索・評価が可能になると期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

表1 ヒト大動脈内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現が上昇した分泌蛋白コード遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	高ブドウ糖 負荷(HG)	通常ブドウ糖 負荷(LG)	発現比 (HG/LG)	t-test
CST1	cystatin SN	562.9	99.3	5.670	0.0134
PI16	peptidase inhibitor 16	27.9	7.6	3.679	0.0100
TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	32.6	15.9	2.043	0.0388
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	126.7	62.8	2.017	0.0023
LAMA5	laminin, alpha 5	712.7	320.8	2.221	0.0009
LAMC2	laminin, gamma 2	37.7	18.5	2.032	0.0396
CST4	cystatin S	216.0	58.0	3.722	0.0084
STC1	stanniocalcin 1	230.2	76.3	3.015	0.0064
STC1	stanniocalcin 1	230.2	76.3	3.015	0.0064
PLAT	plasminogen activator, tissue	1321.4	547.5	2.414	0.0008
SRGN	serglycin	41.0	18.4	2.232	0.0199

表2 ヒト腎系球体内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現が上昇した分泌蛋白コード遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	高ブドウ糖 負荷(HG)	通常ブドウ糖 負荷(LG)	発現比 (HG/LG)	t-test
ARSG	arylsulfatase G		13.8	2.260	0.0146
SRGN	serglycin	45.2	22.3	2.029	0.0031
	arginine-rich, mutated in early				
ARMETL1	stage tumors-like 1	11.9	4.4	2.680	0.0294
PLAT	plasminogen activator, tissue	1093.6	328.5	3.329	0.0000
	insulin-like growth factor binding				
IGFBP5	protein 5	34.7	14.5	2.400	0.0173
MPZL2	myelin protein zero-like 2	131.8	62.0	2.125	0.0154
	POM (POM121 homolog, rat) and				
POMZP3	ZP3 fusion	60.7	25.9	2.346	0.0101
STC1	stanniocalcin 1	1212.2	278.0	4.360	0.0011
	serpin peptidase inhibitor, clade B				
SERPINB2	(ovalbumin), member 2	194.1	102.0	1.904	0.0331
	tumor necrosis factor receptor				
TNFRSF11B	superfamily, member 11b	25.8	12.8	2.021	0.0216
CST1	cystatin SN	979.7	222.8	4.398	0.0002
CST4	cystatin S	313.8	101.9	3.079	0.0006
PRSS3	protease, serine, 3	869.5	400.6	2.171	0.0011
CST2	cystatin SA	195.4	53.7	3.636	0.0015
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	4446.2	1793.4	2.479	0.0001
PRSS3	protease, serine, 3	1160.5	475.1	2.443	0.0000
	protease, serine, 1 (trypsin 1) /				
PRSS1	trypsinogen C	290.4	127.6	2.276	0.0032
FBN2	fibrillin 2	83.2	28.2	2.950	0.0001
PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)	198.1	84.4	2.348	0.0276
	ecto-NOX disulfide-thiol				
ENOX1	exchanger 1	17.7	6.1	2.909	0.0090
	tumor necrosis factor (ligand)				
TNFSF15	superfamily, member 15	243.2	107.6	2.260	0.0012
GDF15	growth differentiation factor 15	3621.6	1842.9	1.965	0.0000
	ADAM metallopeptidase with				
ADAMTS1	thrombospondin type 1 motif, 1	1721.6	805.3	2.138	0.0042
	tumor necrosis factor (ligand)				
TNFSF13B	superfamily, member 13b	18.3	7.9	2.327	0.0355
TMEM178	transmembrane protein 178	19.9	6.3	3.148	0.0462
CDCP1	CUB domain containing protein 1	24.0	10.2	2.343	0.0199

表3 ヒト皮膚微小血管内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現が上昇した分泌蛋白コード遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	高ブドウ糖 負荷(HG)	通常ブドウ糖 負荷(LG)	発現比 (HG/LG)	t-test
IFNE	interferon, epsilon	46.9	10.3	4.572	0.0474
NRP2	neuropilin 2	333.5	110.9	3.007	0.0468
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	471.4	45.6	10.327	0.0177
CD276	CD276 molecule	25.6	11.2	2.288	0.0233
COPA	coatomer protein complex, subunit alpha	27.5	13.6	2.029	0.0087
PLAT	plasminogen activator, tissue	2897.7	820.3	3.532	0.0214
EGFR	epidermal growth factor receptor	45.0	19.8	2.273	0.0219
MPZL2	myelin protein zero-like 2	636.7	284.7	2.236	0.0001
STC1	stanniocalcin 1	223.6	92.1	2.427	0.0386
NRG1	neuregulin 1	96.1	45.1	2.129	0.0342
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	64.1	23.0	2.790	0.0142
TLL1	tolloid-like 1	103.8	25.8	4.025	0.0050
MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	177.9	84.9	2.095	0.0346
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	42.8	13.9	3.086	0.0010
IL1A	interleukin 1, alpha	59.9	19.4	3.091	0.0056
AMY1A	amylase, alpha 1A (salivary)	64.8	26.8	2.413	0.0015
METTL7A	methyltransferase like 7A	226.1	72.8	3.107	0.0394
PTH1H	parathyroid hormone-like hormone	32.3	13.0	2.484	0.0300
SECTM1	secreted and transmembrane 1	56.2	24.2	2.321	0.0304
COL4A6	collagen, type IV, alpha 6 endoplasmic reticulum	276.6	138.1	2.003	0.0040
ERAP1	aminopeptidase 1	29.8	10.3	2.904	0.0002
ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	61.6	18.1	3.406	0.0472
TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	807.0	349.1	2.312	0.0029
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	42.6	17.2	2.472	0.0303
COL27A1	collagen, type XXVII, alpha 1	289.3	121.0	2.391	0.0473
AADA1	arylacetamide deacetylase-like 1	229.2	104.4	2.194	0.0064
ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9	324.2	131.7	2.461	0.0005
LRR39	leucine rich repeat containing 39	21.6	10.1	2.126	0.0396
NTM	neurotrimin	47.4	22.5	2.111	0.0247
AGPAT4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4	62.8	31.0	2.023	0.0066
TMEM178	transmembrane protein 178	213.7	42.6	5.014	0.0013
MPZL2	myelin protein zero-like 2	359.0	150.7	2.382	0.0014
FAM24B	family with sequence similarity 24, member B	109.7	37.6	2.914	0.0000
YME1L1	YME1-like 1 (S. cerevisiae)	164.8	60.4	2.728	0.0413
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1	74.5	26.2	2.841	0.0269