

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 春日 雅人

平成23（2011）年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

糖尿病性細小血管症マーカー探索研究の現状と展望・・・・・・・・・・1

春日 雅人

### II. 分担研究報告

1. 糖尿病腎症マウスモデルを用いた腎症関連因子の探索・・・・・・・・・・5

久保田 浩之、鐺木 康志

2. MRM 法による糖尿病性細小血管症診断マーカー候補蛋白の定量解析・・・・39

加納 圭子、鐺木 康志

3. 尿ペプチドーム解析による糖尿病性細小血管症診断マーカー候補の探  
索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52

佐藤 恵美、鐺木 康志

4. 自然発症糖尿病モデル LEA/Sendai ラットの血清プロテオーム解析・・・・64

高橋 枝里、鐺木 康志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・70

## 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マーカー探索研究の現状と展望

研究代表者 春日 雅人

国立国際医療センター

研究所 糖尿病研究センター

所長

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600名及び糖尿病患者1200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検体収集が進行中である。プロテオーム解析法としては、前年度に主要な解析法として選択したMRM法について、その解析法をほぼ確立している。また、我々はnanoLC/QSTARシステムを用いて尿ペプチドのリスト化を行っており、このリストからMRM解析を用いて糖尿病性腎症にて変動する尿ペプチドマーカーを探索していく。本研究にて糖尿病性細小血管症を診断可能なバイオマーカーが発見されれば、診断法が確立されればその意義は大きい。

## 糖尿病とバイオマーカー

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。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、糖尿病性腎症が原因の透析導入患者数はいまだに増え続けて透析導入原因疾患の40%以上と第1位を占めている。また、糖尿病性網膜症からの失明患者は失明原因の2位、糖尿病性壊疽からの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は国民健康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・進行性などを診断可能な診断指標（バイオマーカー）が

開発されれば、その意義は高い。

糖尿病の診療においては、既に血糖、HbA1cが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予後を的確に判定することが可能な血液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)。

このように、糖尿病患者由来サンプルからの糖尿病性細小血管症の新規診断マーカーの探索には意義がある。バイオマーカー探索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液が第一の研究対象となるが、同定されたバイオマーカー候補がどの臓器での病態を反映しているかを把握することは糖尿病が全身疾患であるが故に困難である。このため、我々

は前年度からtargeted proteomicsの一手法であるMRM法を本計画の中心的な解析法とすることに変更した。本法では、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より高感度で解析を行うことが可能である。また、動物実験や細胞での実験により、あらかじめ糖尿病に関連した変化が起ることが判明している蛋白について、糖尿病性細小血管症の進行度がわかっている患者検体をMRM法にて解析することによって、糖尿病性細小血管症バイオマーカーとしての意義を直接検証することができる。最近、MRMの測定条件についてはSRM Atlas等のデータベースも公開されており、これらも利用して我々はMRM法での解析法をほぼ確立している。慢性疾患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は確立されたシングルマーカー自体がほとんどなく、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。本研究は、日常診療の場で診断が困難な初期の糖尿病性細小血管症を診断可能なバイオマーカーを開発することを目指しており、診断法が確立されればその意義は大きい。

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が行われている (Merchant et al. J Am Soc Nephrol. 20:2065, 2009; Good et al. Mol Cell Proteomics 9:2424, 2010; Good et al. Proteomics Clin Appl. 4:464, 2010)。本研究にて我々はnanoLC/QSTARシステムを用いて尿ペプチドのリスト化を行っており、このリストからMRM解析を用いて糖尿病性腎症にて変動する尿ペプチドマーカーを探索していく。

## 結論

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指している。微量蛋白も定量可能なMRM法を中心にして、詳細な臨床情報を有する糖尿病患者サンプルを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：

Takarabe D, Rokukawa Y, Takahashi Y, Goto A, Takaichi M, Okamoto M, Tsujimoto T, Noto H, Kishimoto M, Kaburagi Y, Yasuda K, Yamamoto-Honda R, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kajio H, Kikuchi Y, Oka S, Noda M. Autoimmune diabetes in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* (2010) 95, 4056-4060

Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Le Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis.* In press

Unoki-Kubota H, Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resi-

stance in obese, type 2 diabetic mice. *Protein Pept Lett.* (2010) 17, 1177-1181

学会発表：

田中崇裕, 櫻田紳策、高橋枝里, 鏑木康志, 平野久, 小林信之、原田登之, 慶長直人 活動性結核患者血漿タンパク質の2D-DIGEとLC-MS/MSによる解析 日本プロテオーム機構第8回大会 第6回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会 浦安 7月26～27日 ポスター発表

加納圭子、佐伯久美子、本間綾香、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、湯尾明、久保田浩之、鏑木康志 An approach to find plasma biomarker for Diabetic microangiopathy using MRM method. 日本分子生物学会第33回年会 神戸 12月10日 ポスター発表

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. 糖尿病腎症マウスモデルを用いた腎症関連因子の探索

久保田浩之、鏑木 康志

国立国際医療研究センター

研究所 糖尿病研究センター

臓器障害研究部

#### 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。同定分泌蛋白の一つである蛋白 A は糖尿病腎症マウスモデルである KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓において対照群と比べ発現量が増加していた。免疫染色による検討では蛋白 A は主に対照 BALB/cA マウス腎組織の尿細管領域に染色された。一方、KK-A<sup>y</sup> マウス腎組織では尿細管領域の高発現、ならびに糸球体領域での発現が認められた。

さらに糖尿病腎症の寛解に関連する因子を探索する目的で、糖尿病腎症マウスによる腎症寛解モデルを用い腎臓において発現変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。16 週齢の糖尿病腎症マウスに低分子量ヘパリンを 4 週間投与すると、尿中蛋白質排泄量は対照群に比べ有意に低下した。腎皮質における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ法により解析した結果、対照群に比べ低分子量ヘパリンを投与した群で 2 倍以上発現上昇した遺伝子プローブセット 153、2 倍以上発現低下した遺伝子プローブセット 155 が同定された。Gene ontology (GO) 解析の結果、これらの遺伝子群はいずれも Biological Process-FAT, Cellular Component-FAT, Molecular Function-FAT の 3 カテゴリーで発現変動割合が高かった。低分子量ヘパリン投与マウス腎臓において発現上昇する遺伝子群に関する Gene clustering 解析の結果、“defense response”, “response to wounding”, “inflammatory response”, “acute inflammatory response” の GO term を含む annotation cluster に関連づけられた 16 遺伝子が共通した機能的特徴を有する遺伝子として抽出された。今後、同定した遺伝子群の発現部位や機能を in vitro, in vivo にて詳細に検討し糖尿病腎症の寛解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腎症のマーカー蛋白の探索・評価が可能になることが期待される。

## A. はじめに

国際糖尿病連合は 2009 年の国際調査において世界の糖尿病人口は 2 億 8500 万人に達し、前回 2006 年の国際調査の発表から 3 年余りで約 4000 万人増加したことを報告した。今後も糖尿病人口の増加傾向は続き、2030 年までに北米の人口よりも多い 4 億 3500 万人にも達すると予測されている<sup>1)</sup>。一方、日本では、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。糖尿病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状態を特徴とするが、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。

ところで糖尿病性細小血管症の一つである糖尿病腎症は 1998 年から我が国の透析療法導入原疾患の第 1 位となって以降増加し続け、2009 年には全透析療法導入者数の中で 44.5% を占めるに至っている。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。一方で腎症の治療法は進歩しており、医療機関継続受診例では腎症の発症・進展ともに抑制され、最近では腎症の寛解が生じえることも報告されている。血糖・血圧・血中脂質の目標値を定め、種々の因子を積極的に管理する集約的治療の有効性を微量アルブミン尿を呈する 2 型糖尿病症例を対象に検討した Steno-2 study では、集約的治療を行うと、4 年で細小血管症の発症・進行が、8 年で心血管イベントの発生が有意に抑制されることが示されている<sup>2)</sup>。さらに、日本人の糖尿病腎症患者を対象とした follow-up study では、1 型、2 型を問わず、微量アルブミン期 (2 期) からは約 50%、顕性蛋白尿期 (3 期) からも約 30% が寛解 (remission) や退縮 (regression) することが多く論文で報告されてきた<sup>3)</sup>。しかしその機序に関しては不明な点が多く残され、仮に腎症の寛解に関連する因子が同定されれば糖尿病腎症の病態形成における新たな原理の解明や標的分子の探索につながるばかりでなく、糖尿病腎症の予防・治療法や腎症進展リスクの予知手段の新たな開発に結びつく可能性があり医療費抑制の一助を



担うことも期待される。

## B. 研究目的

本研究では糖尿病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、2つの解析アプローチを試みた。(1)糖尿病腎症の発症・進展に関連する因子を探索する目的で、高ブドウ糖負荷により発現変動する腎血管内皮細胞由来分泌蛋白を網羅的に探索した。(2)糖尿病腎症の寛解に関連する因子を探索する目的で、糖尿病腎症マウスによる腎症寛解モデルを用い腎臓において発現変動する遺伝子群をDNAマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

## 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 (腎糸球体内皮細胞、大動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞) (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 (旭硝子(株)、東京) 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%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 (H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen Corp., 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 に再懸濁しフローサイトメーター (FACSCalibur, BD Biosciences, 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。

### ・実験動物

雄性 KK-A<sup>y</sup> マウス、ならびに対照マウスとして BALB/cA 系雄性マウスに固形飼料 (CE-2、日本クレア) および水を自由に摂取させ1週間馴化させた後、体重、血糖、随時尿中のアルブミン・クレアチニン比 (ACR) の測定と腎皮質の摘出を行った。

ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 遺伝子をヒトインスリンプロモーター下で過剰発現する雄性トランスジェニックマウス、ならびに対照マウスとして ICR 系雄性マウス (日本クレア) は糖尿病腎症の寛解関連因子の探索のための解析に用いた<sup>4)</sup>。iNOS トランスジェニックマウスは金沢大学大学院医学系研究科 山本博教授より分与された。飼育期間中は一般飼育料飼料 (ラボHスタンダード、日本農産工業株式会社、神奈川) を与え、飼料、水分の摂取は自由とした。すべてのマウスは、同じ飼育室・条件で飼育された。4, 8, 12, 16 週齢において、体重、血糖、随時尿中の ACR を測定した。尿中アルブミンおよび尿中クレアチニンは Albuwell M、ならびに The Creatinine Companion (Exocell Inc., USA) により測定した。血糖測定は、16時間絶食後に後眼窩静脈叢より採取した血液をテルモメディセ

ーフフィット (テルモ、東京) により測定した。血清クレアチニンはラボアッセイクレアチニン(和光純薬工業(株)、大阪)を用い測定した。顕性腎症を呈する16週齢より iNOSトランスジェニックマウスに低分子量ヘパリン(フラグミン静注5000 (80 IU/day), Pfizer Inc., USA)、あるいは生理食塩水を皮下注射により投与した。4週間後、体重、血糖、随時尿中のアルブミン・クレアチニン比(ACR)の測定と腎皮質の摘出を行った。

本研究におけるすべての飼育過程および剖検にあたっては独立行政法人国立国際医療研究センター内の承認を受け、実施に当たっては機関の指針を遵守した。

#### ・DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

培養ヒト血管内皮細胞、ならびに摘出したマウス腎皮質からのトータル RNA 抽出は RNeasy kit (Qiagen, Germany)を用いて行った。RNA の品質を Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, USA)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  $\mu$ g を用い、one-cycle target labeling and control reagents kit (Affymetrix, USA)を用いて cRNA を合成した。培養ヒト血管内皮細胞、ならびにマウス腎臓の遺伝子発現解析はそれぞれ Human Genome-U133 Plus 2.0 アレイ、Mouse Genome 430 2.0 アレイ (Affymetrix)を用い、マイクロアレイ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。

#### ・DNA マイクロアレイデータのノーマライズおよび遺伝子の選択

MicroArray Suite 5.0 法を用いて、マイクロアレイデータのノーマライズを行った。得られた発現シグナル値の生数値データから上下 2%のはずれ値を除き、それ以外の平均値を 100 に揃えてアレイ間における発現シグナル値の相互比較を行った。Human Genome-U133 Plus 2.0 の 54,613 プロ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。

一方、Mouse Genome 430 2.0 の約 39,000 プロブセットの発現強度については、iNOS トランスジェニックマウスへの「低分子量ヘパリン投与群」(n=2)と「生理食塩水投与群」(n=2)の2群における FC を求めた後、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 となるプロブセットを抽出した。ヘパリン投与群で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 average linkage 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、類似尺度を correlation (uncentered) にした。

#### ・リアルタイムPCR解析

腎皮質から抽出したトータルRNAからの cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡績(株)、大阪) を用いて行った。遺伝子特異的プライマー、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) および得られた cDNA を用い定量的 PCR を行った。Real-time PCR system (StepOne リアルタイム PCR システム、Applied Biosystems) を用い増幅を行い、その遺伝子発現量を Ct 値 (threshold cycles) で評価し、 $\beta$ -actin mRNA 量で標準化した。PCR のサイクルは、95°C/10分、95°C/15秒、60°C/60秒を 40 サイクルに設定し行った。

#### ・ウェスタンブロット法による蛋白発現の検討

切り出したマウス腎皮質の一部を RIPA バッファー (ナカライテスク、京都) の中でホモジナイズし、遠心後に得られる上清を抽出画分とした。各群の 10  $\mu$ g 蛋白にサンプルバッファー (312.5 mmol/l Tris  $\cdot$  Cl, pH6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.025% bromophenol blue) を加え、4-20% グラジエントアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。Bio-Rad Trans Blot cell (Bio-rad Laboratories, USA) を用い PVDF 膜に転写後、一次抗体 (蛋白 A goat anti-human polyclonal (C-terminus) antibody, LifeSpan BioSciences, Inc, USA)、二次抗

体 (Donkey anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) を各々室温で 1 時間反応させ、最後に化学発光法 (ECL Plus: GE Healthcare, USA) を使用し可視化した。

#### ・免疫染色

マウス腎臓組織を 4% パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した後、パラフィン切片を作製した。切片をスライドグラスにマウントし正常ヤギ血清 (VECTOR LABORATORIES, INC., USA) で 1 時間反応させた後、一次抗体 (1:50; 蛋白 A goat anti-human polyclonal (C-terminus) antibody, LifeSpan BioSciences, Inc) に浸し、4°C で一晩放置した。次に、二次抗体 (1:200; Biotinylated anti-goat antibody (VECTOR LABORATORIES, INC.) に浸し室温で 2 時間作用させた後、VECSTATIN ABC-AP reagent、ならびに Vector Red AP Substrate kit I (VECTOR LABORATORIES, INC.) を用いて発色を行い、最後にマイヤーのヘマトキシリン染色を行った。

#### ・統計解析

結果は平均値  $\pm$  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

(1) 高ブドウ糖負荷により発現変動する腎血管内皮細胞由来分泌蛋白の探索と糖尿病腎症との関連の検討

・細胞内 ROS の測定

ヒト腎血管内皮細胞 (HGVEC) 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 日間培養すると、高ブドウ糖環境下で培養した細胞内 ROS 産生量は正常ブドウ糖環境下で培養した細胞に比べ

て有意に上昇した (図 1)。同様にヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) 内の ROS 産生量は高ブドウ糖環境下で 6 日間培養した際に正常ブドウ糖濃度培地培養下の細胞に比べ有意に上昇した (図 1)。

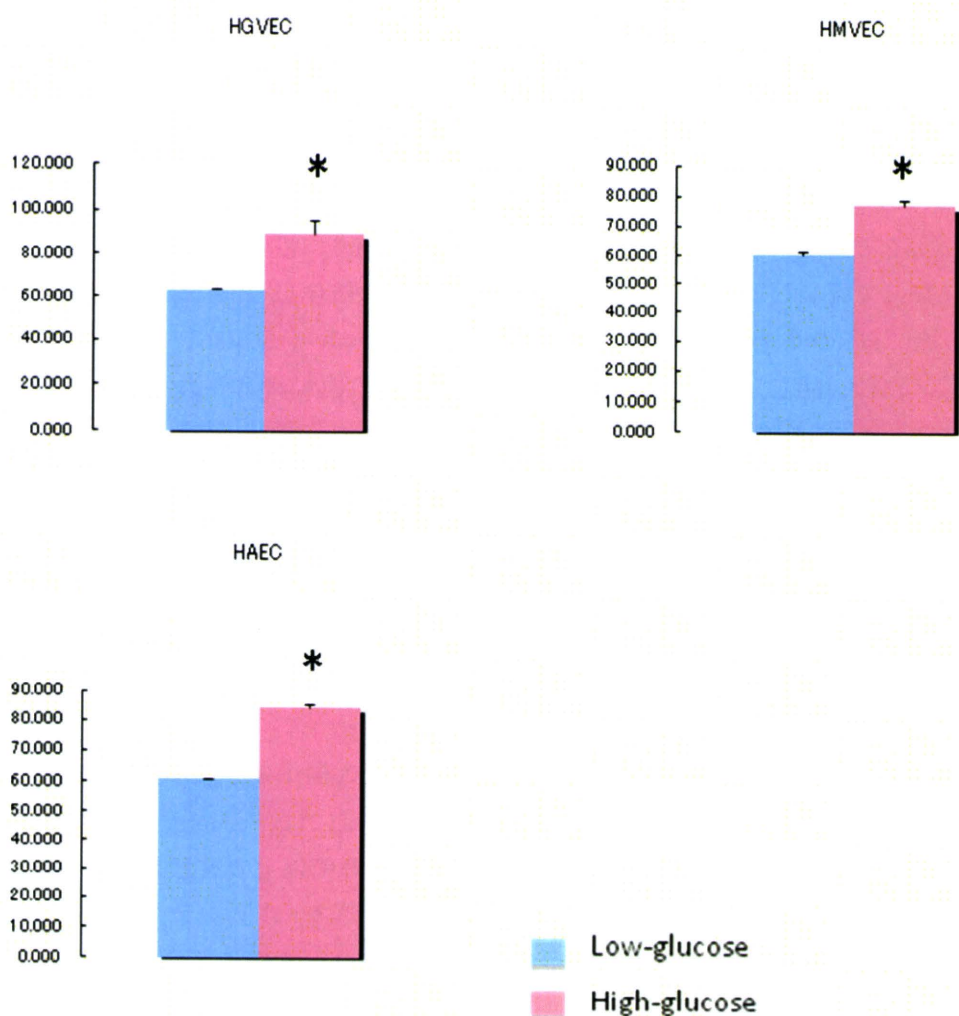


図 1 ヒト腎血管内皮細胞 (HGVEC)、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) における細胞内 ROS 産生量の測定。HGVEC を正常ブドウ糖濃度培地 (Low-glucose, 5 mM) または高ブドウ糖濃度培地 (High-glucose, 30 mM) にて 5 日間培養後  $H_2DCFDA$  を添加し蛍光強度を測定した。HMVEC, HAEC の ROS 産生量は高ブドウ糖環境下で 6 日間培養した後に測定した。独立した 3 回の実験での平均値  $\pm$  標準偏差でデータを表した。\*:  $p < 0.05$

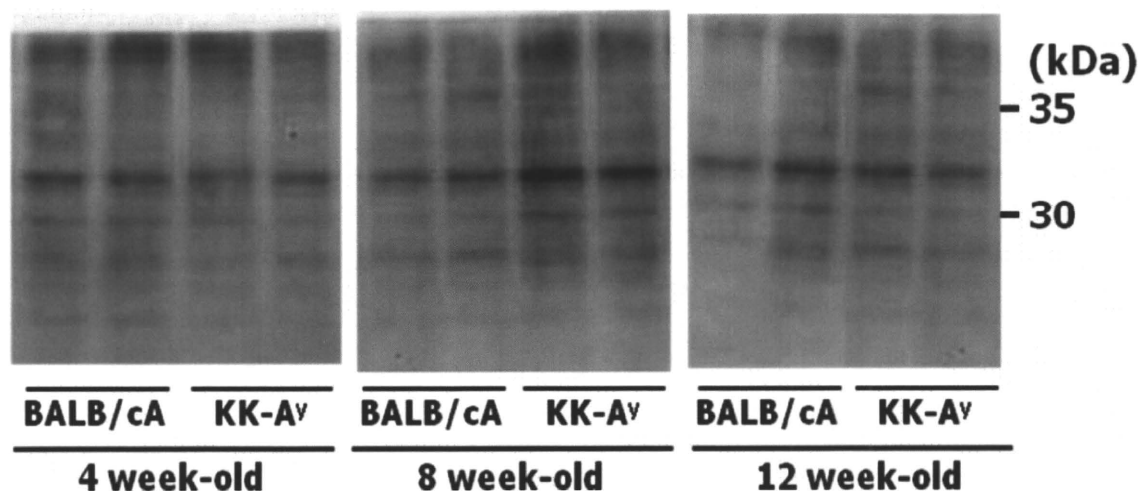


図2 糖尿病腎症マウス KK-A<sup>y</sup> マウス腎皮質での Western blotting によるマーカー候補蛋白の発現検討

・細胞内 ROS 上昇により発現変動する血管内皮細胞由来分泌蛋白遺伝子の探索

細胞内 ROS 上昇により発現変動する HGVEC 由来分泌蛋白遺伝子を探索する目的で HGVEC を正常ブドウ糖環境下、高ブドウ糖環境下にてそれぞれ 5 日間培養し total RNA を抽出した。HMVEC および HAEC 由来 total RNA はそれぞれの細胞を正常ブドウ糖環境下、高ブドウ糖環境下にて 6 日間培養した後に調製した。HGVEC, HMVEC, HAEC において高ブドウ糖負荷により発現上昇する分泌蛋白遺伝子を DNA マイクロアレイにて解析した結果、insulin-like growth factor binding protein 5, tissue plasminogen activator, stanniocalcin 1, tumor necrosis factor superfamily, member 15 の 4 遺伝子は 3 種の細胞全てにおいて発現上昇した。一方、HGVEC, HMVEC, HAEC のいずれかにおいてのみ発現上昇する遺伝子を解析した結果、HGVEC では 14

種、HMVEC では 32 種、HAEC では 4 種の遺伝子が得られた。HGVEC 特異的な発現変動蛋白は糖尿病腎症の発症・進展に関連する可能性があることから、HGVEC において発現上昇する分泌蛋白遺伝子 14 種 (表 1) に着目し、これらの蛋白発現を糖尿病腎症モデルマウスである KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓にて検討した。その結果、8 週齢 KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓では対照 BALB/cA マウス群と比べ蛋白 A の発現量が増加している傾向を認めた。(図 2)。腎臓における蛋白 A の発現部位を免疫染色法により検討したところ、BALB/cA マウス腎臓では主に尿細管領域に染色され、糸球体領域における染色はほとんど認められなかった (図 3 A-B)。KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓においても蛋白 A は尿細管領域に染色されたが、BALB/cA マウスに比べ強い染色像を呈した (図 3 C)。さらに KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓では、蛋白 A の発現が腎糸球体領域にも認められた (図 3 D)。

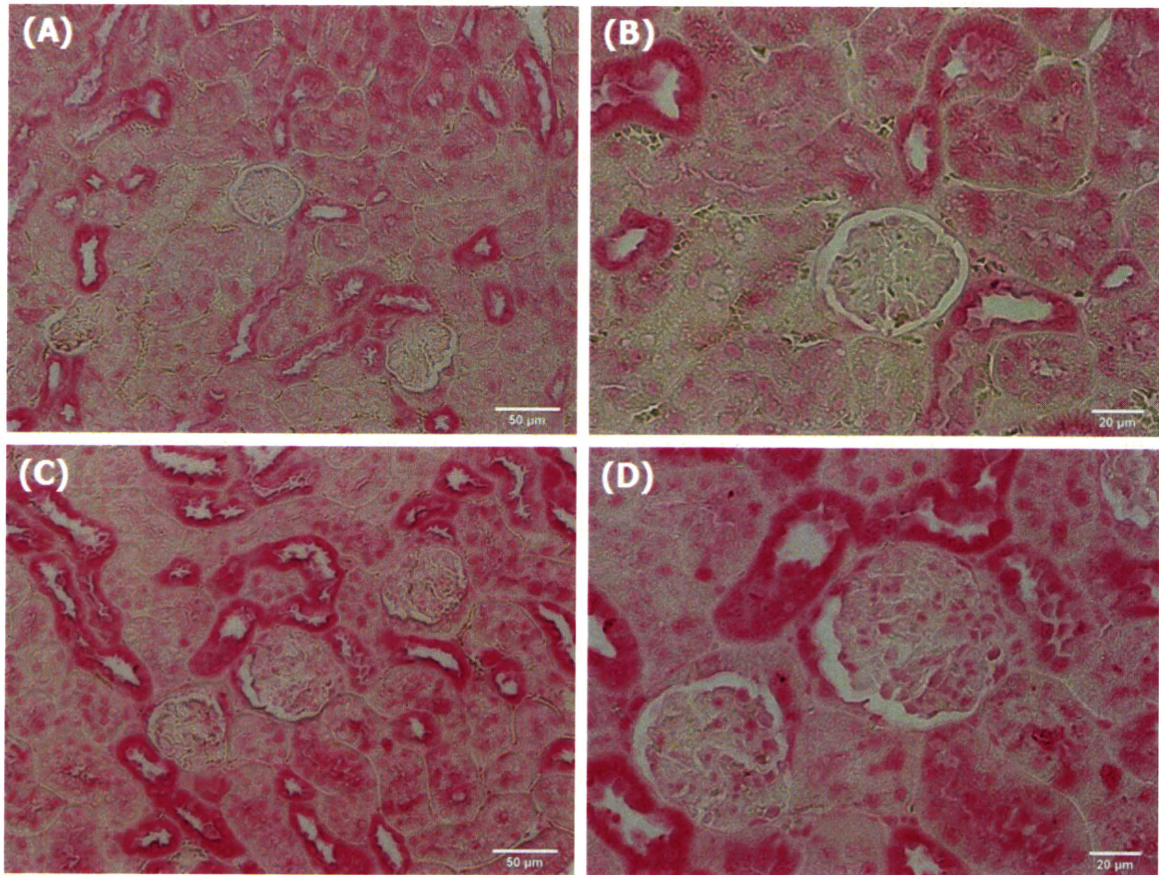


図3 8週齢 KK-A<sup>y</sup> マウスにおける蛋白 A の腎免疫組織染色

(A-B) 8週齢 BALB/cA マウス腎臓、(C-D) 8週齢 KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓。図中のスケールはそれぞれ(A), (C): 50 μm、(B), (D): 20 μm を示す。

## (2) 糖尿病腎症マウスによる腎症寛解モデルを用いた寛解関連因子の探索

iNOSトランスジェニックマウスは膵ラ氏島においてiNOSを発現しており、脳や肝臓、腎臓や小腸における発現は検出されない(図4A)。iNOSトランスジェニックマウスでは生後1週齢より膵ラ氏島におけるiNOSの発現が認められ、4週齢iNOSトランスジェニックマウスの膵β細胞ではアポトーシスによる細胞死により膵臓におけるβ細胞集団の割合が対照群に比べて著しく減少する(図4B)。一方、iNOSトランスジェニックマ

ウスの膵外分泌細胞ではiNOS発現を認めない。iNOSトランスジェニックマウスはインスリン分泌不全のため1週齢より高血糖を呈し、4週齢までに著しい多飲症や多尿を呈する(図5A)。16週齢iNOSトランスジェニックマウスの尿中アルブミン量は対照群に比べ有意に高値であった(ICRマウス  $72.8 \pm 36.3$  mg/gCre vs iNOSトランスジェニックマウス  $315.6 \pm 214.3$  mg/gCre,  $p=0.003$ , 図5B)。16週齢iNOSトランスジェニックマウス、ならびにICRマウスの典型的な糸球体PAS染色像を図5Cに示す。iNOSトランスジェニックマウスの糸球体では糖尿病腎症に

認められる特徴的な糸球体組織変化である糸球体分節性硬化が認められ、尿中への蛋白質漏出の一因と考えられる。

iNOSトランスジェニックマウスへの低分子量ヘパリン投与前、ならびに投与4週間後におけるiNOSトランスジェニックマウス尿中のACRを図6Aに示す。投与開始前は両群の尿中蛋白質排泄量は同程度であったが(生理食塩水投与群 164.0±26.3 mg/gCre vs 低分子量ヘパリン投与群 217.7±27.9 mg/gCre,  $p=0.07$ ) (図5B)、生理食塩水投与群では投与開始4週間後には尿中蛋白質

排泄量が約1.8倍に増加した。一方、低分子量ヘパリン投与群では尿中蛋白質排泄量が0.7倍に減少する傾向が認められ、生理食塩水投与群に比べ有意に低値を示した(生理食塩水投与群 293.7±27.7 mg/gCre vs 低分子量ヘパリン投与群 155.3±2.2 mg/gCre,  $p=0.001$ )。一方、投与後の血清クレアチニン濃度は低分子量投与群で生理食塩水投与群に比べ低下する傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった(0.53±0.04 mg/dL vs 0.39±0.18 mg/dL,  $p=0.27$ ) (図6B)。

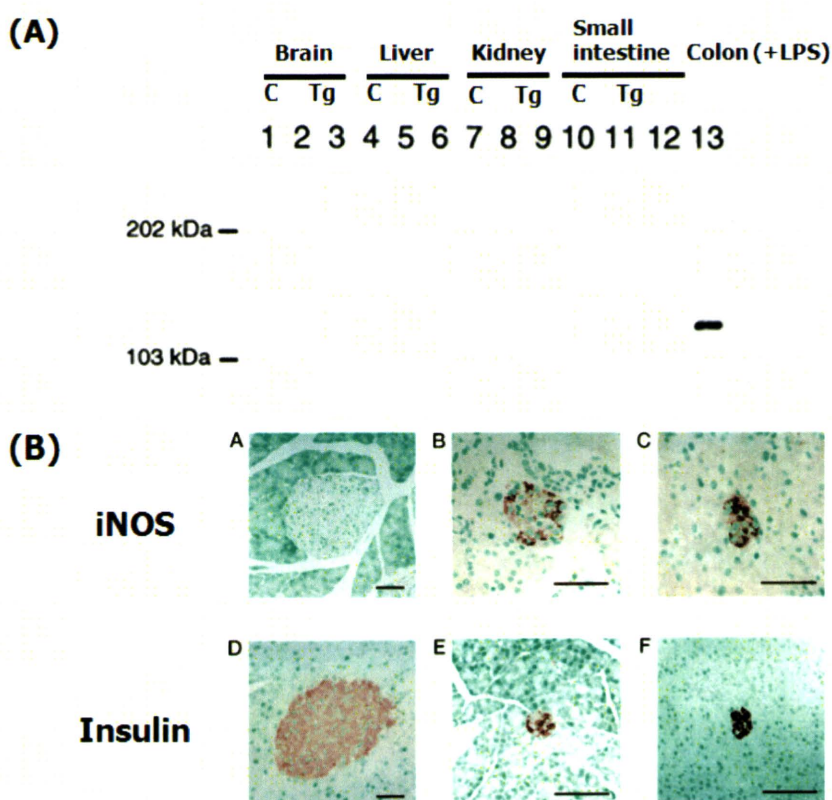


図4 iNOSトランスジェニックマウスにおけるiNOS発現の検討

(A) iNOSトランスジェニックマウス脳、肝臓、腎臓、小腸でのWestern blottingによるiNOS蛋白の発現検討。(B)マウス膵臓におけるiNOS(A-C)、ならびにインスリン蛋白(D-F)の免疫組織染色像。A, D: 対照ICRマウス。B, E: iNOSトランスジェニックマウス(line 31)。C, F: iNOSトランスジェニックマウス(line 40)。(J Biol Chem, 273, 2493-2496, 1998より引用改変)

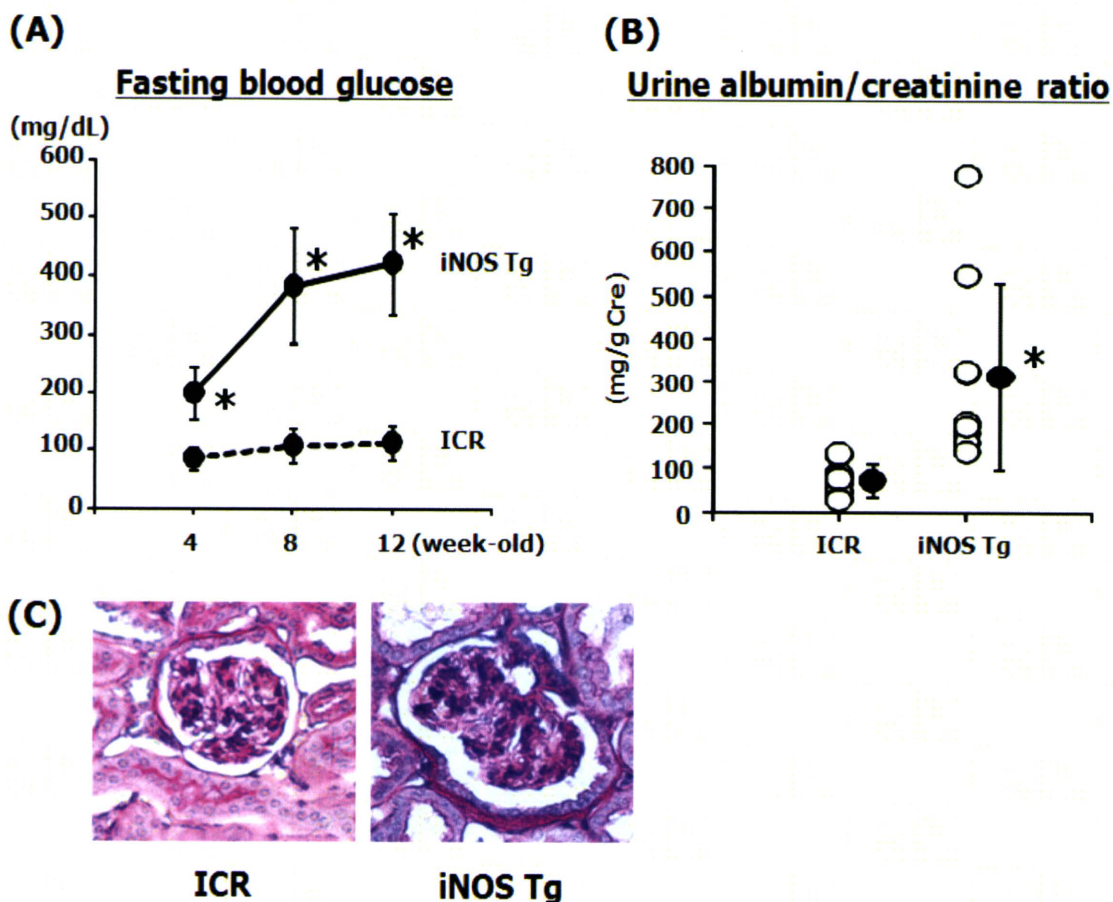


図5 iNOS トランスジェニックマウス血糖の変動 (A)、尿中蛋白質排泄量 (B)、腎組織の PAS 染色像 (C)。血糖の推移は 4, 8, 12 週齢マウスにおいて、尿中蛋白質排泄量、ならびに PAS 染色像は 16 週齢マウスを用いて解析した。データは平均値±標準偏差で表した。\*:  $p < 0.05$ 。

・低分子量ヘパリン投与マウス腎臓における発現変動遺伝子の解析

低分子量ヘパリン投与マウス、ならびに生理食塩水投与マウス腎皮質より抽出したトータル RNA を用いて行った DNA マイクロアレイ解析により、低分子量ヘパリン投与マウスで発現差のあった遺伝子群の同定を行った。約 39,000 プローブセットのうち、生理食塩水投与マウスに比べ低分子量ヘパリン投与マウスで  $FC < 0.5$ ,  $FC > 2$  となる

448 プローブセットを発現差のある遺伝子群として抽出し、階層的クラスター解析により比較した(図7)。

その結果、抽出したプローブセットは 4 つの大きなクラスターに分類され、その中には 2 回の比較においていずれも発現上昇する 153 プローブセットを含むクラスター 1 (表 2)、ならびに 2 回の比較においていずれも発現低下する 155 プローブセットを含むクラスター 4 (表 3)が含まれていた。



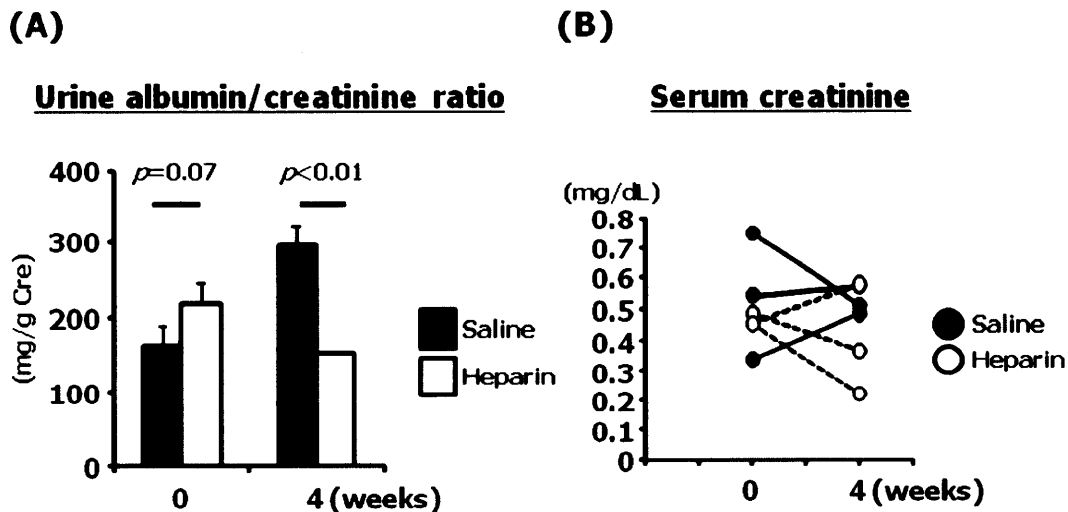


図6 iNOS トランスジェニックマウスへの低分子量ヘパリン投与の影響

顕性腎症を呈する16週齢よりiNOSトランスジェニックマウスに低分子量ヘパリン（フラグミン静注5000 (80 IU/day), Pfizer Inc., USA)、あるいは生理食塩水を皮下注射により投与した。4週間後、体重、血糖、随時尿中のアルブミン・クレアチニン比(A)と血清クレアチニン値(B)を測定した。データは平均値±標準偏差で表す。

・Functional Annotation Tool による解析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りマウス腎臓におい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。低分子量ヘパリン投与マウス腎臓において

有意に発現上昇する遺伝子間に共通する機能的特徴を検索するために Gene ontology (GO) 解析を試みた結果、Biological Process-FAT, Cellular Component-FAT, Molecular Function-FAT の3カテゴリーが有意な発現変動割合を示すカテゴリーとして抽出された ( $p < 0.05$ )。Functional Annotation Clustering 解析の結果 47 クラスタが抽出され、"defense response", "response to wounding", "inflammatory response", "acute inflammatory response" の GO term を含む annotation cluster 1 の enrichment score は 5.68、"immune response", "immune effector process", "myeloid leukocyte

activation”, “cell activation”, “leukocyte activation” の GO term を含む annotation cluster 2 の enrichment score は 4.2 を示した (図 8)。また、

Annotation cluster 1 に関連付けられた遺伝子には C-type lectin domain family 7, member a, Fc receptor, IgG, low affinity III, cathelicidin antimicrobial peptide,

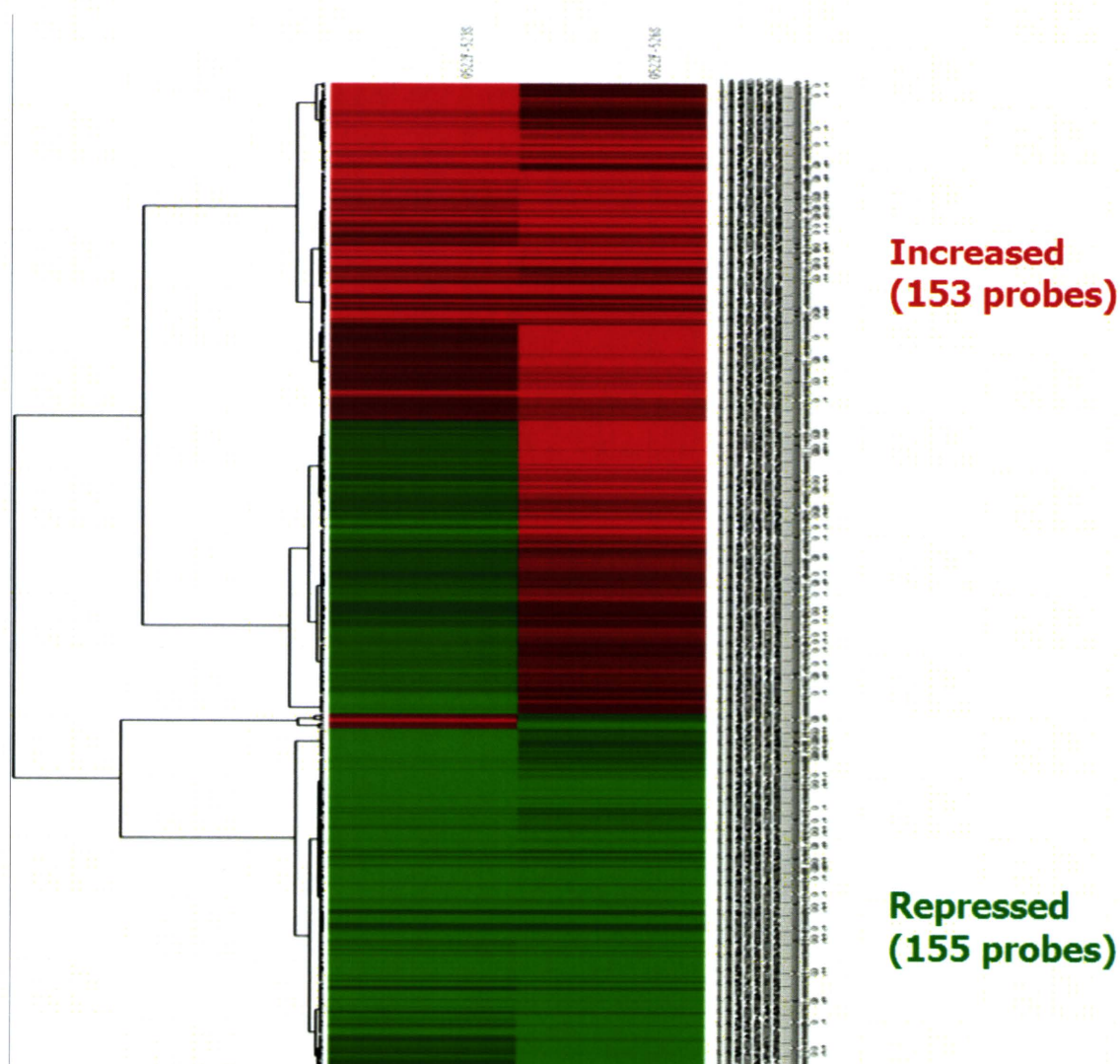


図 7 低分子量ヘパリン投与マウス腎臓における発現変動遺伝子の解析

低分子量ヘパリン投与マウス、ならびに生理食塩水投与マウス腎皮質の 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った。Fold-change (FC) < 0.5, FC > 2.0 となる 448 プローブセットを抽出し、Cluster 3.0 ソフトウェアを用いて average linkage 法により階層的クラスタリングを行った。

chemokine (C-C motif) receptor 1, complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide, histocompatibility 2, Q chitinase 3-like 4, region locus 1; histocompatibility 2, Q region locus 9; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor; histocompatibility 2, Q region locus 8; histocompatibility 2, Q region locus 2; similar to MHC class Ib antigen; histocompatibility 2, Q region locus 7; histocompatibility 2, Q region locus 6; hypothetical protein LOC100044307; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen); RIKEN cDNA 0610037M15 gene, histocompatibility 2, class II antigen A, alpha; histocompatibility 2, class II antigen E alpha, lipopolysaccharide binding protein, myosin IF, neutrophilic granule protein, phospholipase A2, activating protein, serum amyloid A 1, serum amyloid A 3, similar to Chitinase 3-like protein 3 precursor (Secretory protein Ym1) (Eosinophil chemotactic cytokine) (ECF-L); chitinase 3-like 3; predicted gene 6522, toll-like receptor 13 の 16 遺伝子が含まれた。

同様に、低分子量ヘパリン投与マウス腎臓において有意な発現低下する遺伝子群に関しても GO 解析を行った結果、Biological Process-FAT, Cellular Component-FAT, Molecular Function-FAT の 3 カテゴリーが有意な発現変動割合を示すカテゴリーとして抽出された ( $p < 0.05$ )。Functional

Annotation Clustering 解析の結果 33 クラスターが抽出されたものの顕著な発現変動割合を示すカテゴリーは認められなかった (図 9)。最も高い enrichment score を示した annotation cluster 1 には "identical protein binding", "protein homodimerization activity", "protein dimerization activity" の GO term が含まれ、関連付けられた遺伝子は CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma, aminolevulinate, delta-, dehydratase, cadherin 13, dynamin 1, interferon inducible GTPase 1; interferon-inducible GTPase-like, runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related), vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C であった。

#### 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、分泌蛋白 A の発現量は 8 週齢 KK-A<sup>y</sup> マウス腎臓において対照 BALB/c マウスより高く、尿細管領域での強い発現に加え、腎糸球体領域での発現も認められた。今後、糖尿病腎症の発症・進展における分泌蛋白 A の発現調節機序、ならびに腎構成細胞に対する役割を詳細に検討する必要がある。加えて、ヒト 2 型糖尿病腎症患者を対象とし、腎症の病期分類ごとの血中、あるいは尿中分泌蛋白 A 濃度を解析し、分泌蛋白 A 濃度上昇が糖尿病発症で既に認められるか、糖尿病腎

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 5.68			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">defense response</a>	RT		16	7.3E-8	7.0E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">response to wounding</a>	RT		14	1.7E-7	8.0E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">inflammatory response</a>	RT		11	1.1E-6	3.5E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">acute inflammatory response</a>	RT		5	1.5E-3	7.0E-2
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 4.2			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">immune response</a>	RT		14	5.1E-6	9.9E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">immune effector process</a>	RT		8	1.2E-5	1.9E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">myeloid leukocyte activation</a>	RT		5	5.9E-5	8.1E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell activation</a>	RT		9	1.3E-4	1.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">leukocyte activation</a>	RT		7	2.2E-3	8.2E-2
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 2.96			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of immune system process</a>	RT		10	4.4E-6	1.1E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">immune response</a>	RT		14	5.1E-6	9.9E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">immune effector process</a>	RT		8	1.2E-5	1.9E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of response to stimulus</a>	RT		8	1.4E-4	1.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">adaptive immune response</a>	RT		6	1.6E-4	1.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains</a>	RT		6	1.6E-4	1.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of immune response</a>	RT		7	1.8E-4	1.6E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">leukocyte mediated immunity</a>	RT		6	2.1E-4	1.7E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Systemic lupus erythematosus</a>	RT		6	2.7E-4	1.9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">B cell mediated immunity</a>	RT		5	6.6E-4	4.2E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">lymphocyte mediated immunity</a>	RT		5	1.2E-3	6.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">antigen processing and presentation</a>	RT		5	2.0E-3	7.9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">immunoglobulin mediated immune response</a>	RT		4	6.7E-3	1.7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">regulation of cytokine production</a>	RT		5	1.0E-2	2.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of lymphocyte activation</a>	RT		4	2.0E-2	3.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of leukocyte activation</a>	RT		4	2.3E-2	3.4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of cell activation</a>	RT		4	2.4E-2	3.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">positive regulation of immune effector process</a>	RT		3	3.2E-2	4.1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">activation of immune response</a>	RT		3	9.7E-2	7.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">vesicle-mediated transport</a>	RT		6	1.6E-1	8.4E-1
Annotation Cluster 4		Enrichment Score: 2.39			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">antigen processing and presentation of peptide antigen</a>	RT		4	1.2E-3	6.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">antigen processing and presentation</a>	RT		5	2.0E-3	7.9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen</a>	RT		3	8.6E-3	2.1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">antigen processing and presentation of exogenous antigen</a>	RT		3	1.3E-2	2.4E-1
Annotation Cluster 5		Enrichment Score: 2.27			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">disulfide bond</a>	RT		31	1.0E-4	3.4E-2
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">disulfide bond</a>	RT		31	1.0E-4	2.0E-2
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">glycoprotein</a>	RT		33	1.2E-2	2.5E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">signal</a>	RT		28	1.7E-2	3.0E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)</a>	RT		32	1.9E-2	8.1E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">Secreted</a>	RT		16	2.4E-2	3.7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	<a href="#">extracellular region</a>	RT		18	2.5E-2	6.9E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">signal peptide</a>	RT		28	2.6E-2	7.8E-1

図8 低分子量ヘパリン投与マウス腎臓で発現上昇する遺伝子間に共通する機能的特徴の解析 2回の比較においていずれも発現上昇する153プローブセットを用い、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)の遺伝子機能分類を適用した。