

201107002A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 春日 雅人

平成24 (2012) 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. 非標識定量解析ソフトウェア 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索 . . . . . 9

久保田 浩之、鏑木 康志

2. 血中タンパク質が網膜毛細血管内皮細胞に及ぼす影響の解析 . . . 21

奥村 彰規、鏑木 康志

3. 尿プロテオ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 . . . . . 39

佐藤 恵美、鏑木 康志

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 51

- IV. その他（総説など） . . . . . 55

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

独立行政法人 国立国際医療研究センター

研究所

所長／糖尿病研究センター長

近年急増している糖尿病は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を合併し、その進行とともに失明、腎不全、下肢切断等の重篤な合併症を引き起こす。本研究では、糖尿病性細小血管症関連蛋白あるいはペプチドを培養細胞や疾患モデル動物の解析にてリストアップした後にこれらの分子の病態マーカーとしての意義を臨床検体にて MRM 法で検証することによって、効率的な糖尿病性細小血管症の早期診断マーカー開発を目的とする。本計画では、本施設を含めた3医療機関から糖尿病患者1200名、健常者600名を目標に血清、尿、糖尿病性細小血管症を含む臨床情報の収集が進行中である。前年度までの培養細胞及び腎症モデル動物の解析によりリストアップされたマーカー候補蛋白について、患者血清及び尿を試料として MRM 解析を行い、診断マーカーとしての意義を検討する。まず本施設のパネルでの検討からバイオマーカー候補蛋白を選択し、他施設のパネルにてその意義を検証する。一方、尿蛋白及びペプチドについては LC-MS/MS での網羅的解析系にて尿ペプチド(1500個以上)、尿蛋白(1400個以上)のリスト化を行った。さらに糖尿病腎症の各病期のプール尿を用いた解析にて腎症の各病期の指標となりうる尿蛋白及びペプチドをリストアップした。これらの腎症マーカー候補分子について、尿検体での MRM 法での解析を行い、腎症マーカーとしての意義を検証する。これらの検討により糖尿病性細小血管症の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。

## 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。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targeted proteomicsの一手法であるMRM法を本計画の中心的な解析法としている。本法は、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こ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。

本研究では、本施設を含めた3医療機関から糖尿病患者1200名、健常者600名を目標に血清、尿、糖尿病性細小血管症を含む臨床情報の収集が進行中である。前年度までの血管内皮細胞、尿細管上皮細胞及び腎症モデル動物の解析によりリストアップされた細小血管症バイオマーカー候補蛋白について、糖尿病患者血清を試料としてMRM定量解析を行い、診断マーカーとしての意義を検討している。本施設のパネルでの検討から細小血管症との関連が示唆されたバイオマーカー候補蛋白については、他の2施設のパネルにてその意義を検証していく。

また、尿蛋白及びペプチドについては、従来の二次元泳動を用いた手法では非常にスループットが低いため、LC

-MS/MSでの網羅的解析系を立ち上げて尿ペプチド（1500個以上）、尿蛋白（1400個以上）の検出が可能となった。さらに、糖尿病腎症の各病期のプール尿にて安定同位体標識による定量法であるiTRAQ法によるディファレンシャル解析を行った結果、腎症の各病期の指標となりうる尿蛋白及びペプチドがリストアップされた。これらの腎症マーカー候補分子について、尿検体でのMRM法での解析を行い、腎症マーカーとしての意義を検証していく。

## 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標としている。通常のMS/MS解析と比較して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信頼性の高い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：

- Shim JH, Greenblatt MB, Singh A, Brady N, Hu D, Drapp R, Ogawa W, Kasuga M, Noda T, Yang SH, Lee SK, Rebel VI, Glimcher LH. Administration of BMP2/7 in utero partially reverses Rubinstein-Taybi syndrome-like skeletal defects induced by Pdk1 or Cbp mutations in mice. *J Clin Invest.* (2012) 122, 91-106
- Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kido Y, Hosooka T, Asahara SI, Matsuda T, Ota T, Watanabe H, Sai Y, Miyamoto K, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits STAT3-Dependent Suppression of Hepatic Gluconeogenesis via Dephosphorylation and Deacetylation. *Diabetes* (2012) 61, 61-73
- Tawaramoto K, Kotani K, Hashiramoto M, Kanda Y, Nagare T, Sakaue H, Ogawa W, Emoto N, Yanagisawa M, Noda T, Kasuga M, Kaku K. Ablation of 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) in Vascular Endothelial Cells Enhances Insulin Sensitivity by Reducing Visceral Fat and Suppressing Angiogenesis. *Mol Endocrinol.* (2012) 26, 95-109
- Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS One.* (2011) 6, e23238
- Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, Cao Y, Inagaki K, Sakai M, Takashima Y, Nakamura K, Mori T, Okada Y, Matsuki Y, Watanabe E, Ikeda K, Taguchi R, Kamimura N, Ohta S, Hiramatsu R, Kasuga M. Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhance-

- ent of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem.* (2011) 286, 37458-37469
- Li S, Ogawa W, Emi A, Hayashi K, Senga Y, Nomura K, Hara K, Yu D, Kasuga M. Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* (2011) 412, 197-202
- Cao Y, Nakata M, Okamoto S, Takanoto E, Yada T, Minokoshi Y, Hirata Y, Nakajima K, Iskandar K, Hayashi Y, Ogawa W, Barsh GS, Hosoda H, Kangawa K, Itoh H, Noda T, Kasuga M, Nakae J. PDK1-Foxo1 in agouti-related peptide neurons regulates energy homeostasis by modulating food intake and energy expenditure. *PLoS One.* (2011) 6, e18324
- Seike M, Saitou T, Kouchi Y, Ohara T, Matsuhisa M, Sakaguchi K, Tomita K, Kosugi K, Kashiwagi A, Kasuga M, Tomita M, Naito Y, Nakajima H. Computational assessment of insulin secretion and insulin sensitivity from 2-h oral glucose tolerance tests for clinical use for type 2 diabetes. *J Physiol Sci.* (2011) 61, 321-330
- Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamachi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, Kadowaki T. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab.* (2011) 13, 401-412
- Tsujimoto T, Kajio H, Takahashi Y, Kishimoto M, Noto H, Yamamoto-Honda R, Kamimura M, Morooka M, Kubota K, Shimbo T, Hiroe M, Noda M. Asymptomatic coronary heart disease in patients with type 2 diabetes with vascular complications: a cross-sectional study. *BMJ Open.* (2011) 1, e000139
- Ikeda N, Saito E, Kondo N, Inoue

- M, Ikeda S, Satoh T, Wada K, Stickley A, Katanoda K, Mizoue T, Noda M, Iso H, Fujino Y, Sobue T, Tsugane S, Naghavi M, Ezzati M, Shibuya K. What has made the population of Japan healthy? *Lancet* (2011) 378, 1094-1105
- Nanri A, Mizoue T, Noda M, Takahashi Y, Matsushita Y, Poudel-Tandukar K, Kato M, Oba S, Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Fish intake and type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr.* (2011) 94, 884-891
- Tanaka T, Morita A, Kato M, Hirai T, Mizoue T, Terauchi Y, Watanabe S, Noda M; SCOP Study Group. Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP). *Endocr J.* (2011) 58, 589-596
- Noda M. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Pract.* (2011) 17, 616-628
- Goto M, Yamamoto-Honda R, Shimbo T, Goto A, Terauchi Y, Kanazawa Y, Noda M. Correlation between baseline serum 1,5-anhydroglucitol levels and 2-hour post-challenge glucose levels during oral glucose tolerance tests. *Endocr J.* (2011) 58, 13-17
- Hayashino Y, Suzuki H, Yamazaki K, Izumi K, Noda M, Kobayashi M. Depressive symptoms, not completing a depression screening questionnaire, and risk of poor compliance with regular primary care visits in patients with type 2 diabetes: the Japan Diabetes Outcome Intervention Trial 2 (J-D OIT2) study group. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* (2011) 119, 276-280
- Nanri A, Mizoue T, Takahashi Y, Matsushita Y, Noda M, Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health C



enter-based Prospective Study Group. Association of weight change in different periods of adulthood with risk of type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-Based Prospective Study. *J Epidemiol Community Health*. (2011) 65, 1104-1110

Matsushita Y, Nakagawa T, Yamamoto S, Takahashi Y, Noda M, Mizoue T. Associations of smoking cessation with visceral fat area and prevalence of metabolic syndrome in men: the Hitachi health study. *Obesity* (2011) 19, 647-651

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*. (2011) 11, 71

Kaburagi Y, Unoki-Kubota H. Role of the podocyte signal-transduction systems in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetol Int*. (2011) 2, 160-161

学会発表:

加納圭子、本間綾香、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、佐伯久美子、湯尾明、久保田浩之、鏑木康志 糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 札幌 5月19日 口頭発表

本間綾香、加納圭子、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、佐伯久美子、湯尾明、久保田浩之、鏑木康志 MRM法を用いた糖尿病性細小血管症バイオマーカーの探索 日本プロテオーム機構第9回大会 新潟 7月28~29日 ポスター発表

佐藤 恵美、加納 圭子、久保田 浩之、鏑木 康志 尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索 第23回糖尿病性腎症研究会 東京 12月3日 口頭発表

高橋枝里、奥村彰規、加納圭子、久保田浩

之、岡村匡史、平野久、鏑木康志 血清  
プロテオーム解析による2型糖尿病関連  
因子の探索 第34回日本分子生物学会  
年会 横浜 12月14日 口頭発表

患バイオマーカー研究. 糖尿病・肥満. 日  
本臨牀 2012年 Vol. 70 No. 5 769-773

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定  
を含む)

奥村彰規、高橋枝里、久保田浩之、平野久、  
岡村匡史、鏑木康志 2型糖尿病関連血  
清タンパク質が網膜血管内皮細胞に及ぼ  
す影響の解析 第34回日本分子生物学  
会年会 横浜 12月14日 口頭発表

該当事項なし

田中 崇裕、櫻田紳策、加納圭子、佐藤恵  
美、鏑木康志、小林信之、慶長直人 結  
核患者における血漿ペプチドーム解析に  
よるバイオマーカー探索 第34回日本  
分子生物学会年会 横浜 12月14日  
ポスター発表

総説:

鏑木康志. 基礎講座 ゲノミクス・プロテオ  
ミクス・メタボロミクス. II プロテオミクス. プ  
ロテオミクスを用いた糖尿病診断マーカー  
の探索. Diabetes Frontier 2011年 Vol. 22  
No. 4 39-43

山下亮、曾我朋義、鏑木康志. 特集 糖  
尿病とその合併症—最新の知見— メタボロ  
ームと糖尿病. 最新医学 2012年 Vol.  
67 No. 1 2011-2018

鏑木康志、久保田浩之. 特集:最新の疾

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

非標識定量解析ソフトウェア 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索  
久保田 浩之、鏑木 康志

独立行政法人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

糖尿病の特徴は慢性的な高血糖により糖尿病性細小血管症が引き起こされることであり、自覚症状を伴わずに網膜症では失明、腎症では腎不全、神経障害では壊疽による下肢切断などへと進行する。本研究では糖尿病性細小血管症の原因または診断標的となりうる蛋白質の同定を目的として、糖尿病性細小血管症患者血清にて発現変動する蛋白質を非標識定量解析ソフトウェア 2 Dimensional Image Converted Analysis of LC-MS (2DICAL)を用いて解析した。健常人群(H)、2型糖尿病群(DM)、糖尿病性網膜症群(DR)、糖尿病腎症群(DN)として各群5人を選択し、5人の血清を等量混合することにより各群のサンプルを調製し、血中多量蛋白質の除去後、LC-MS/MS測定を行った。2DICAL解析の結果、全サンプルより2800ピークが検出され、これらのペプチドはMascotを用いたデータベース検索の結果827蛋白質に対応した。このうちH群に対してDM群、DR群、DN群のいずれかで3倍以上発現上昇したピーク数は369(261蛋白質)、3倍以上発現低下したピーク数は930(497蛋白質)であった。これらの蛋白質の血清濃度を測定するにあたり、一斉分析が可能な定量解析法であるMultiple reaction monitoring (MRM)法を試みた。上記2DICAL法により発現変動差異を認めた758蛋白質のうち、既報によりMRM定量法が確立している32蛋白質を対象として測定した結果、健常人群に比べ2型糖尿病患者群でのみ発現上昇する蛋白質が4種、糖尿病網膜症群で発現減少する蛋白質が3種、糖尿病腎症群で発現低下する蛋白質が2種認められた。これらの発現変動蛋白質について臨床データとの相関解析を行ったところ、Serum amyloid P-component, Ceruloplasmin, L-selectinの3タンパク質のみが相関を示し、これら3蛋白質に共通して相関した項目はHbA1cであった。2型糖尿病や糖尿病性血管合併症の進展が高血糖に長期間晒されることにより進展することを考えると、2型糖尿病や糖尿病性血管合併症の病態においてこれらの蛋白質は重要な役割を担うことが推察される。今回解析対象としなかった蛋白質についても血清濃度と糖尿病性細小血管症との関連を解析し、新たな病態関連蛋白質の同定を目標に検討を継続している。

## A. 研究目的

糖尿病患者は 2007 年国民健康・栄養調査では約 890 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。また、新規バイオマーカー発見は糖尿病合併症の早期発見のみならず、合併症発症の機序解明、合併症予防薬開発にとっても必要である。

バイオマーカー探索の手法としては、近年、質量分析計の急速な進歩に伴い、生体試料からタンパク質を網羅的に解析するプロテオームの手法を用いた研究が世界中で急速に広まっている。その際に臨床検体として広く使用されている血液については、個々の蛋白の血中濃度のダイナミックレンジが著しく広いことから網羅的な解析が困難であり、疾患の主座となる臓器、組織からの検体での解析が主体となることが多い。しかしながら、糖尿病の場合は診療の現場で臓器、組織から検体を採取することはきわめて困難であり、日常的に採取されるのは血液あるいは尿のみである。そこで今回、糖尿病性細小血管症患者血清にて発現

変動する蛋白質を非標識定量解析ソフトウェア 2 Dimensional Image Converted Analysis of LC-MS (2DICAL)を用いて解析し、高感度で特異的に多種類のタンパク質を一斉定量することができる Multiple reaction monitoring (MRM)法を用いて発現変動蛋白質群の血中濃度と糖尿病性細小血管症との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 解析対象検体

国立国際医療研究センター病院糖尿病・代謝・内分泌科に通院する血管合併症を併発していない 2 型糖尿病患者(男性 14 名、女性 3 名)、糖尿病網膜症患者(男性 8 名、女性 6 名)、糖尿病腎症患者(男性 13 名、女性 6 名)から採取した血清を解析対象とした。2 型糖尿病の診断は日本糖尿病学会の「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告」に基づいて行った。糖尿病性網膜症群は 2 型糖尿病を有し福田分類 A1 以降の患者を、糖尿病腎症群は網膜症を有し、顕性蛋白尿(+)、尿潜血(-)の患者を対象とした。また、対照健常人群として国立国際医療研究センター病院人間ドックに来院した男性 5 名、女性 7 名からも同様に血清を採取した。健常人群、2 型糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群の臨床情報を表 1 に示す。

なお、本研究の実施に当たり事前に国立国

際医療研究センター倫理委員会にて研究遂行内容の承認を受けた。被験者に対しては、研究の趣旨や被験者の利益、不利益、権利などを十分に説明し、インフォームドコンセントが得られた被験者からのみ血清を採取した。

## 2. 血清ペプチドの調製

健常人群、2型糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群の患者より採取した血清は速やかに凍結し解析に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保管した。健常人群、2型糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群のサンプルは各群より各5人を選択し、5人の血清を等量混合することにより調製した。各群のサンプルからIgY14 Spin Column Kit (Sigma-aldrich)を用いて多量蛋白質を除去し、3 kDa Amicon Ultrafree で限外ろ過後、乾燥させて0.5%SDC/SLSに溶解し、Lys-C とトリプシンにより消化した後、還元アルキル化した。消化物はGL-Tip SDBにより脱塩した後に強陽イオン交換体カラムを用いて分画を行った。各群のサンプルから調製した40画分をそれぞれ脱塩、乾燥し、0.1% TFAにて溶解したものを血清ペプチドサンプルとしてLC-MS/MS解析に用いた。

## 3. LC-MS/MS解析

血清ペプチドサンプルの解析はエレクトロスプレーイオン化 QSTAR Elite Hybrid MS/MS spectrometer を接続した Paradigm MS4 capillary LC システム(AMR)にて行った。サン

プルは $0.3\ \mu\text{l}/\text{min}$ でトラップカートリッジにアプライ後、C-18 カラム( $\phi 0.1$ , 150 mm、財団法人化学物質評価研究機構製)を用いて 0.1% formic acid、2%アセトニトリル溶媒、ならびに 0.1% formic acid、90%アセトニトリル溶媒を用いて溶出した。質量分析器のピークの検出と正規化、定量化は 2 Dimensional Image Converted Analysis of LC-MS (2DICAL、三井情報株式会社)ソフトウェアを用いて行った。ピーク同定は SwissProt データベースを用いて Mascot ソフトウェア(マトリックスサイエンス)により行った。Mascot ソフトウェアの検索パラメータは以下を用いた。生物種、ヒト; 分解酵素、トリプシン; 分解エラー許容数、1; 固定修飾、carbamidomethyl (C); 可変修飾、oxidation (M); MS 許容誤差、0.1 Da; MS/MS 許容誤差、0.1 Da;  $^{13}\text{C}$  含有数、1; 価数、2+, 3+, 4+; score threshold,  $p < 0.05$ 。健常人群に対して2型糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群で発現差異を認めるピークの選定は、それぞれの群で抽出されたピーク定量値が健常人群に対して3倍以上変動しているものを対象とした。これらの発現変動ピークを対象に主成分分析(PCA)を行い、PCA 分離に寄与する蛋白質を抽出した。

健常人群に対して2型糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群で発現差異を認めるピークの選定は、それぞれの群で抽出されたピーク定量値が健常人群に対して3倍以上変動しているものを対象とした。これらの発現変動ピークを対象に主成分分析(PCA)を行い、

PCA 分離に寄与する蛋白質を抽出した。

#### 4. MRM 定量解析

IgY14 Spin Column Kit (Sigma-aldrich)により多量蛋白質を除去した血清をトリプシン消化し脱塩後、 $18\mu\text{l}$ の0.1% TFA-2% アセトニトリル溶液に溶解した。MRM 定量解析の内部標準ペプチドとして安定同位体元素標識ペプチド  $4\mu\text{l}$ (30fmol)を加えて  $22\mu\text{l}$ とし、そのうち  $20\mu\text{l}$ を解析に用いた。MRM 定量解析はエレクトロスプレーイオン化三連四重極型質量分析装置 QTRAP4000 (AB Sciex)を接続した Paradigm MS4 capillary LC システムにて行った。サンプルは  $0.3\mu\text{l}/\text{min}$  でトラップカートリッジにアプライ後、C-18 カラム( $\phi 0.1$ 、150 mm、財団法人化学物質評価研究機構製)を用いて流速  $300\text{nl}/\text{min}$ 、5%から40%アセトニトリルの90分直線濃度勾配にて溶出した。MRM 測定後、Multiquant Software 2.0(AB Sciex)でピーク面

積を解析した。

#### 5. 統計学的解析

各群の値は平均値 (Mean)  $\pm$  標準偏差 (SD) で示した。各群間の有意差検定は独立 t 検定や一元配置分散分析 (one-way ANOVA)を用い、 $p < 0.05$  を有意差有とした。

#### C. 研究結果

糖尿病、糖尿病性網膜症、糖尿病腎症に関連する血清蛋白質を同定する目的で、各群 5名ずつの血清プール検体と健常人群 5名の血清プール検体を用い 2DICAL による血清プロテオーム解析を行った。得られた MS ピークのうち MS/MS 同定情報があるピーク数は 2800 ピークであり、これら

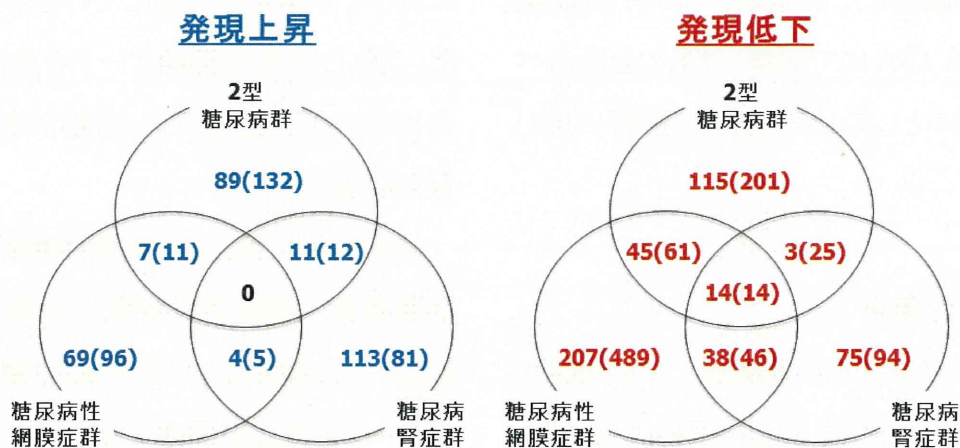


図1 健常人群に対して3倍以上発現変動した蛋白質数



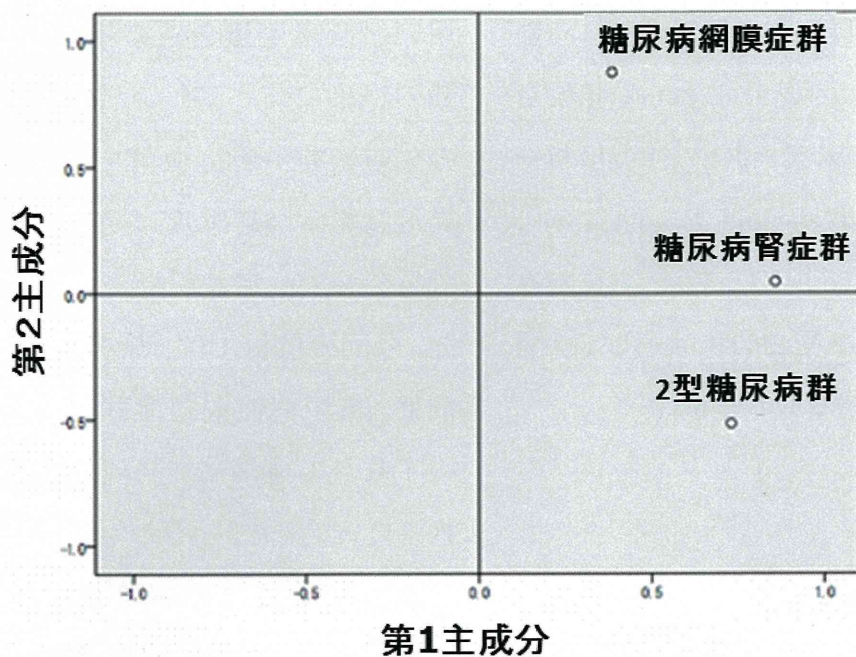


図2 PCAのスコアプロット

のペプチドは Mascot を用いたデータベース検索の結果 827 蛋白質に対応した。このうち健康人群に対して糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群のいずれかで3倍以上発現上昇したピーク数は 369(261 蛋白質)、3 倍以上発現低下したピーク数は 930(497 蛋白質)であった(図 1)。これらの合計 1299 ピークを対象に主成分分析(PCA)を行い PCA 分離に寄与する蛋白質を抽出した。PCA 解析により固有値が 1 以上となる 2 個の成分が求められ、累積寄与率は 81.8%であった。第 1 主成分、第 2 主成分を対象として作成したスコアプロットでは、DR 群、DN 群、DM 群が第 2 主成分の方向に明確に分離した(図 2)。両者の分離にどの

ような蛋白質が寄与しているかを主成分の係数を用いたローディングプロットにより推測した結果、44 蛋白質が第 2 主成分の方向への分離に大きく寄与した(表 2)。これらの蛋白質の血清濃度を測定するにあたり、一斉分析が可能な定量解析法である Multiple reaction monitoring (MRM)法を試みた。上記 2DICAL 法により発現変動差異を認めた 758 蛋白質のうち、既報により MRM 定量法が確立している 32 蛋白質を対象とした(Michael A et al. Mol Cell Proteomics 8:1860-1877, 2009; Kim et al. J Proteome Res 9:689-699, 2010) (表3)。健康人、2 型糖尿病患者、糖尿病性網膜症患者、糖尿病腎症患者より採取した血清を用いて 32

蛋白質濃度を測定した結果、健常人群に比べ2型糖尿病患者群でのみ発現上昇する蛋白質が4種、糖尿病網膜症群で発現減少する蛋白質が3種、糖尿病腎症群で発現低下する蛋白質が2種認められた(表4)。これらの発現変動蛋白質について臨床データとの相関解析を行ったところ、Serum amyloid P-component, Ceruloplasmin, L-selectinの3タンパク質のみが相関を示し、これら3蛋白質に共通して相関した項目はHbA1cであった(表5)。

#### D. まとめ

厚生労働省が2007年度に発表した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。糖尿病性細小血管症を併発する患者数も増加しており、効率的な治療法や予防法の開発が望まれる。糖尿病や糖尿病性細小血管症の状態を詳細に反映するマーカーが見いだされれば、効率的な治療法や予防法の開発において大きな役割を担うことが期待される。本研究では糖尿病や糖尿病性細小血管症の発症・進展に関連する因子の探索対象を血清としたが、血清は日常診療において多くの病気の診断に用いられる有用な検体であり、かつ検体採取が簡易でコストが低くて済むという利点を持つ。一方で血清にはアルブミン、IgG、凝固線溶系因子を始めとする血中濃度

の高い蛋白質からIL-6サイトカインなど低濃度蛋白質まで多種多量な蛋白質が幅広い濃度分布で存在しているため、特に血清を用いた低濃度蛋白質の検出は高濃度蛋白質の検出に比べ難しいという欠点がある。この欠点を補うべく、血清中の蛋白質をより特異的に、かつ高感度に定量することが可能であるMRM定量解析法を本研究にて試みた。今回の解析では、健常人群に対して糖尿病群、糖尿病性網膜症群、糖尿病腎症群のいずれかの血清にて発現変動する蛋白質を約760同定したが、そのうち、既報によりMRM定量法が確立している32蛋白質を対象として血清濃度の検討を試みた。解析の結果、健常人群に比べ2型糖尿病患者、糖尿病網膜症、糖尿病腎症で発現変動する蛋白質が9種認められた。これらの蛋白質はいずれも2型糖尿病や糖尿病性血管合併症との関連がある蛋白質として報告されており、今回用いた検討でも既報と同様の傾向が認められた。さらに臨床データとの相関を示したSerum amyloid P-component, Ceruloplasmin, L-selectinの3タンパク質はいずれもHbA1cと相関しており、2型糖尿病や糖尿病性血管合併症の進展が高血糖に長期間晒されることにより進展することを考えると、2型糖尿病や糖尿病性血管合併症の病態において重要な役割を担うことが推察される。なお、PCAにより抽出された44蛋白質を始めとする約700蛋白質については今回解析対象としなかったが、現在、MRM定量解析とより詳細な分析を進めており、関連蛋白



質群の同定と糖尿病性細小血管症との関連の解明につなげていきたい。

#### E. 結語

糖尿病性細小血管症患者血清を用い、質量分析器を用いた定量解析により発現変動蛋白質を探索した。MRM 定量解析により 2 型糖尿病や糖尿病性血管合併症との関連がある蛋白質が 9 種認められ、そのうち 3 蛋白質はいずれも HbA1c との相関を示した。今回解析対象としなかった蛋白質の血清濃度と糖尿病性細小血管症との関連についても引き続き検討し、糖尿病性細小血管症の病態を反映する新たな因子の同定へと結び付けたい。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

なし

学会発表:

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 解析対象患者の臨床データ

	Healthy subjects		Type 2 DM		Diabetic retinopathy		Diabetic nephropathy	
	(M5, F7)		(M14, F3)		(M8, F6)		(M13, F6)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (year)	60.8	7.1	59.2	7.3	64.1	5.9	63.4	6.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6	2.7	24.2	1.3 *	23.9	2.2	24.5	4.1
T2DM Duration (year)	-	-	13.8	7.5	13.1	10	11.3	7.6
SBP (mmHg)	133.2	13.7	118.8	12.6 *	131.8	17.2	133.8	15.5
DBP (mmHg)	85.1	8.6	69.5	8.8 *	73.3	12.2 *	71.4	11.3 *
Fasting glucose (mg/dL)	92.8	5.2	153.1	49.3 *	134.1	31.3 *	139.6	37.1 *
HbA1c (%)	5.1	0.3	7.2	0.8 *	6.6	0.7 *	6.8	0.8 *
TC (mg/dL)	214.7	29.1	169.8	24.2 *	185.4	27.8	185	31.2
TG (mg/dL)	78.1	24.4	121.2	45.7 *	126.1	44.7 *	159.9	90.7 *
HDL (mg/dL)	68.8	14.6	49	8.7 *	55.7	13.2	52.3	20.6
eGFR (mL/minute per 1.73 m <sup>2</sup> )#	75.8	14.9	79.9	20.3	74.3	24.9	59.1	22.1
Albumin Creatinin ratio (mg/g Cre)#	4.1	1.4	12	8.2 *	11.8	7.6 *	1062.6	721.5 **

\*:  $p < 0.05$  compared with control subjects

\*\* :  $p < 0.05$  compared with control subjects and T2DM

表2 第2主成分係数 ≥ |1.5| の蛋白質

UniProt ID	DM/H	DR/H	DN/H	FAC1_1	FAC2_1
HEMO	1.80E+00	4.50E-02	8.50E-01	5.44	-3.8
CO4A	1.60E+00	1.60E-03	3.30E-03	3	-3.61
AMBP	1.20E+00	2.30E-03	4.50E-03	2.11	-2.74
AMBP	1.20E+00	2.30E-03	4.50E-03	2.11	-2.74
SNMP	1.10E+00	2.60E-04	1.10E+00	4.34	-2.45
CERU	1.00E+00	4.20E-03	1.00E-02	1.79	-2.4
CFAH	1.10E+00	1.40E-04	9.10E-01	3.9	-2.4
IRF7	9.90E-01	1.70E-03	1.60E-03	1.63	-2.29
SNMP	1.00E+00	2.00E-04	9.10E-01	3.76	-2.28
KS6A6	1.00E+00	3.10E-04	9.00E-01	3.66	-2.21
A1BG	9.90E-01	1.40E-04	1.20E+00	4.18	-2.13
AACT	9.70E-01	1.00E-04	9.60E-01	3.7	-2.09
AFAM	9.50E-01	1.60E-04	7.70E-01	3.24	-2.09
VTDB	8.60E-01	3.30E-04	1.90E-01	1.74	-1.98
CFAI	8.40E-01	1.20E-04	4.90E-02	1.39	-1.95
CO4A	8.80E-01	6.80E-03	6.50E-01	2.83	-1.93
HEMO	7.90E-01	6.90E-04	3.50E-04	1.17	-1.85
FMO4	8.00E-01	4.40E-03	1.70E-02	1.23	-1.85
IGHA1	8.00E-01	1.00E-02	4.60E-03	1.21	-1.82
IGHA1	8.00E-01	1.00E-02	4.60E-03	1.21	-1.82
ZA2G	8.30E-01	8.10E-05	8.20E-01	3.07	-1.81
IGHA1	8.40E-01	1.60E-04	8.70E-01	3.2	-1.81
CFAH	8.30E-01	3.10E-04	7.90E-01	2.99	-1.81
CFAH	7.60E-01	2.00E-03	1.40E-01	1.41	-1.75
KNG1	7.50E-01	1.60E-04	3.20E-03	1.08	-1.75
SNMP	7.50E-01	1.40E-02	2.10E-03	1.09	-1.69
CO4A	7.20E-01	2.00E-03	8.60E-03	1.03	-1.68
ITIH2	7.00E-01	1.00E-03	2.90E-03	0.96	-1.64
CO4A	7.20E-01	6.10E-04	3.90E-01	1.86	-1.63
A1BG	7.10E-01	5.70E-04	2.50E-01	1.52	-1.62
CLUS	7.20E-01	4.90E-04	7.60E-01	2.67	-1.57
A1BG	7.30E-01	3.10E-04	8.70E-01	2.93	-1.56
CERU	7.30E-01	1.60E-04	8.90E-01	2.97	-1.56
CLUS	7.30E-01	8.10E-04	8.90E-01	2.98	-1.56
CO4A	6.80E-01	7.90E-04	2.80E-01	1.52	-1.55
SV421	7.10E-01	3.10E-04	7.10E-01	2.54	-1.55
CBG	7.10E-01	1.00E-03	7.00E-01	2.53	-1.55
CFAH	7.10E-01	2.60E-04	9.80E-01	3.14	-1.5
KV302	4.20E-03	3.70E-01	1.50E-01	0.16	1.51
FETUA	4.40E-01	6.10E-01	1.30E-03	1.2	1.52
MILK2	1.90E-03	3.70E-01	3.00E-03	-0.15	1.53
KNG1	1.10E-03	3.40E-01	8.80E-01	1.73	1.53
VTDB	1.60E-03	3.80E-01	1.80E-01	0.24	1.56
ITIH4	2.00E-03	3.90E-01	3.30E-01	0.6	1.65
THBG	2.50E-03	4.00E-01	3.40E-01	0.64	1.67
AFAM	3.70E-04	4.20E-01	4.10E-03	-0.09	1.7
HCD2	1.70E-03	4.20E-01	1.10E-03	-0.09	1.71
APOA4	3.90E-03	4.20E-01	1.40E-04	-0.09	1.71
IC1	9.00E-04	4.30E-01	8.80E-02	0.11	1.76
CO4A	2.60E-04	4.30E-01	1.20E-04	-0.08	1.76
CFAI	9.60E-04	4.20E-01	5.10E-01	1.02	1.78
KV201	1.00E-02	4.20E-01	1.00E+00	2.13	1.85
CO8A	1.80E-04	4.40E-01	3.00E-01	0.6	1.85
CO4A	3.50E-04	4.40E-01	4.60E-01	0.95	1.9
ITIH2	6.30E-04	4.60E-01	1.80E-02	0.01	1.92
APOH	5.30E-03	4.60E-01	3.60E-01	0.78	1.94
ITIH4	3.30E-02	5.00E-01	5.60E-03	0.1	1.99
ATS5	7.30E-04	5.10E-01	9.20E-04	0.03	2.09
APOH	2.80E-01	6.60E-01	3.00E-02	0.97	2.13
ANT3	5.50E-04	5.50E-01	3.30E-04	0.08	2.27
K0415	5.40E-03	5.60E-01	3.00E-03	0.11	2.3
CXCL7	2.80E-03	5.50E-01	6.70E-01	1.57	2.38
CO4A	3.50E-03	5.60E-01	4.80E-01	1.17	2.4
ITIH1	2.00E-03	5.80E-01	3.60E-01	0.92	2.45
CO4A	4.40E-03	6.40E-01	4.40E-01	1.18	2.71
A1BG	1.10E-01	7.10E-01	1.50E-02	0.6	2.71
ITIH1	1.60E-03	6.60E-01	5.90E-04	0.23	2.72
HPTR	3.90E-03	6.60E-01	9.00E-03	0.26	2.73
CFAH	3.70E-03	6.70E-01	6.40E-01	1.67	2.9
CFAB	1.00E-04	7.10E-01	2.50E-01	0.84	2.99
CXCL7	5.10E-04	7.60E-01	3.50E-04	0.37	3.17
THBG	8.10E-05	7.40E-01	7.60E-01	2.03	3.22
ANT3	2.30E-03	7.90E-01	6.30E-01	1.81	3.38
APOH	2.90E-04	8.20E-01	9.30E-01	2.49	3.56
ANGT	2.20E-02	8.70E-01	4.90E-03	0.59	3.6
IGKC	5.80E-03	8.60E-01	6.50E-01	1.95	3.68
ANT3	4.10E-05	8.60E-01	7.20E-01	2.09	3.7
TSN14	1.10E-03	8.90E-01	5.10E-04	0.56	3.73
ZA2G	4.10E-03	9.00E-01	5.10E-01	1.71	3.85
ZA2G	6.70E-04	9.10E-01	8.50E-01	2.47	3.96
ITIH1	3.30E-03	9.90E-01	5.10E-01	1.81	4.24
KNG1	1.60E-03	9.50E-01	2.00E+00	5.08	4.29
TMEM5	2.10E-02	1.10E+00	1.70E-02	0.91	4.54
SAMP	9.50E-03	1.10E+00	1.10E+00	3.34	4.94
LG11	6.80E-01	1.50E+00	1.00E-03	3.03	4.98
AACT	1.60E-04	1.10E+00	1.50E+00	4.2	5.01
CO4A	1.30E-03	1.20E+00	7.30E-01	2.57	5.14
AACT	1.30E-03	1.40E+00	7.80E-01	2.92	5.89
CERU	2.40E-04	1.40E+00	1.20E+00	3.9	6.27
IC1	5.90E-03	1.80E+00	9.20E-01	3.89	7.89

表 3 MRM 測定対象タンパク質と MRM 測定設定値

蛋白質名	ペプチド配列	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (m/z)	Fragment ion
Afamin	DADPDTFFAK	563.8	825.4/413.2	24	2y7/2y8
Alpha-1-antichymotrypsin	LINDYVK	432.7	638.3/751.4	24	2y5/2y6
Alpha-1B-glycoprotein	LETPDFQLFK	619.3	243.1/894.5	31	2b2/2y7
Alpha-2-antiplasmin	LGNQEPGGQTALK	656.8	771.4/542.3	33	2y8/2b5
Angiotensinogen	ALQDQLVLVAAK	634.9	956.6/542.8	29	2y10 <sup>2+</sup> /2y9
Antithrombin-III	DDLTVSDAFHK	437.2	540.3/483.7	17	3y9 <sup>2+</sup> /3y8 <sup>2+</sup>
ApolipoproteinCI	TPDVSSALDK	516.8	466.2/834.4	29	2y9 <sup>2+</sup> /2y8
ApolipoproteinC-III	GWVTDGFSSLK	598.8	244.1/854.4	31	3b2/3y8
ApolipoproteinE	LGPLVEQGR	484.8	399.7/588.3	25	2y7 <sup>2+</sup> /2y5
beta2-GlycoproteinI	ATVVYQGER	511.8	652.3/751.4	25	2y5/2y6
Ceruloplasmin	EYTDASFTNR	602.3	624.3/911.4	29	2y5/2y4
Clusterin	ELDESLQVAER	644.8	375.2/802.4	32	2y6/2y3
Coagulation factor XIIIaHC	VVGGLVALR	442.3	685.4/171.1	21	2y7/2a2
Complement C4 beta	VGDTLNLNLR	557.8	629.4/742.5	31	2y5/2y6
Complement C4 gamma	ITQVLHFTK	362.9	487.3/436.8	32	3y8 <sup>2+</sup> /3y7 <sup>2+</sup>
Gelsolin	TGAQELLR	444.3	159.1/530.3	28	2b2/2y4
Hemopexin	NFPSPVDAAFR	610.8	480.3/234.1	25	2y9 <sup>2+</sup> /2a2
Heparin cofactor II	TLEAQLTPR	514.8	814.4/685.4	25	2y7/2y6
Inter-alpha-trypsin inhibitor HC	AAISGENAGLVR	579.3	902.5/815.4	28	2y9/2y8
Kallistatin	LGFTDLFSK	514.3	914.5/857.4	28	2y7/2y8
Kininogen-1	TVGSDFYFSFK	626.3	173.1/1051.5	40	2ya/2y9
L-selectin	AEIEYLEK	497.8	794.4/201.1	21	2y6/2b2
Pigment epithelium-derived factor	TVQAVLTVPK	528.3	855.5/727.5	28	2y7/2y8
Plasma retinol-binding protein	YWGVASFLQK	599.8	549.5/350.2	28	2y8/2b2
Plasminogen	LFLEPTR	438.3	615.3/233.2	21	2y5/2a2
Prothrombin	ETAASLLQAGYK	626.3	679.4/879.5	29	2y8/2y6
Serum amyloid P-complement	VGEYSLYIGR	578.8	708.4/508.3	28	2y6/2y4
Transthyretin	AADDTWEPFASGK	697.8	606.3/921.5	38	2y6/2y8
Vitamin D-binding protein	THLPEVFLSK	390.9	494.3/578.3	17	3y4/3b5
Vitronectin	FEDGVLPDYPR	711.8	875.4/647.3	31	2y7/2y5
Zinc-alpha2-glycoprotein	EIPAWVPFDPAAQITK	892	1087.6/770.9	40	2y10/2y14 <sup>2+</sup>