

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

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

佐藤 恵美、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

研究要旨

糖尿病にて慢性的に進行し重篤な合併症を引き起こすに至る糖尿病性細小血管症を簡便に診断可能とするバイオマーカーの開発は重要である。本研究では、特に糖尿病性腎症のバイオマーカーを探索するために、尿プロテオーム解析をすることにした。

健常者、糖尿病で合併症のない患者、糖尿病で微量アルブミン尿の患者、糖尿病でマクロアルブミン尿の患者の4グループの尿をプロテオーム解析し、iTRAQ法による定量解析を行った。変動のあったタンパク質についてさらに多検体での検証を行うために、スループットの高いMRM解析を行ったところ、糖尿病性腎症ステージごとで有意に変動するタンパク質が見つかった。

今回有意に変動することが確認できたタンパク質は、既報と一致するものもあることから、本手法による解析は糖尿病性腎症のバイオマーカー探索に有効なものであることが分かり、さらに、今回新規に変動がみられた4種類のタンパク質は、新しい糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる可能性がある。

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。国立国際医療センター（当時）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。

糖尿病患者の臨床検体を用いてプロテオーム解析を行う際は、多くの場合に糖尿病診療の現場で日常的に採取される血清や血漿、尿が研究対象となる。ところが、血清や血漿サンプルの特徴として、アルブミンやIgGなどが多量に存在し、バイオマーカー候補になるようなタンパク質は非常に微量で埋もれてしまうという、タンパク質濃度の幅が非常に大きく、また、血液凝固因子も多いためプロテアーゼ活性も高いこと

が問題となる。その点、尿サンプルは、容易に集めることができる上、腎臓でろ過されているため、血液ほど多量タンパク質に邪魔されることがなく解析が可能であり、特に糖尿病性腎症のバイオマーカー探索には腎臓の状態を反映しやすい尿を使うことは有効であると考えられる。

B. 研究方法

1. 臨床検体

今回用いたサンプルは、「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」において国立国際医療センター（当時）にて収集した尿に加え、今回の研究計画にて新たに本施設にて収集した尿検体である。

探索用の検体は、健常者(H)、糖尿病で腎症なし(DN-I)、微量アルブミン尿(DN-II)、マクロアルブミン尿(DN-III)の4群で、4名ずつ、全体で16名のものを用いた (Table 1)。

検証用の検体は、健常者 (H: 8名)、糖尿病で合併症なし (DNI: 7名)、糖尿病性網膜症かつ腎症 II 期 (DNII: 12名)、糖尿病性網膜症かつ腎症 III 期 (DNIII: 6名) の4群、全体で33名のものを用いた (Table 2)。

2. 尿サンプルの処理

尿サンプルは、探索用には4群それぞれを4名分2mlずつをプールし、8mlにして用い、検証用には、各検体それぞれを5mlずつ用いた。

尿サンプルはまず、3 kDa cut off の限外ろ過で脱塩と濃縮を行い、タンパク質濃度を測定した。尿中に多量に存在するアルブミンと IgG を除去するために、Albumin & IgG Depletion SpinTrap (GE Healthcare) を用いた。このとき、SpinTrap の用量 (3 mg) を超えてしまう場合は、数本に分けて処理した。得られた Alb/IgG 除去済み尿タンパク質のタンパク質濃度を測定し、100 ug までの量を次の処理に用いた。

Table 1 : 探索用検体情報

探索用検体	n	Sex	Age	Alb/Cr	HbA1c	Duration	eGFR
	16	M:F		(mg/g)	(%)	(years)	
健常者 (H)	4	2:2	56.3 ± 5.0	7.1 ± 3.3	4.95 ± 0.4	-	84.5 ± 17.0
糖尿病で腎症なし (DN-I)	4	3:1	57.5 ± 5.3	15.3 ± 5.4	8.53 ± 1.8	12.25 ± 7.9	78.6 ± 18.5
糖尿病で微量アルブミン尿 (DN-II)	4	3:1	54.0 ± 4.8	94.1 ± 30.4	7.40 ± 0.8	7.00 ± 2.2	72.0 ± 31.4
糖尿病でマクロアルブミン尿 (DN-III)	4	1:3	58.8 ± 6.3	580.9 ± 218.5	7.53 ± 2.2	7.00 ± 2.0	78.4 ± 42.4

Table 2 : 検証用検体情報

検証用検体	n	Sex	Age	Alb/Cr	HbA1c	Duration	eGFR
	33	M:F		(mg/g)	(%)	(years)	
健常者 (H)	8	6:2	59.1 ± 5.3	-	5.1 ± 0.2	-	107.4 ± 20.8
糖尿病で合併症なし (DNI)	7	5:2	59.7 ± 4.7	9.2 ± 4.5	7.3 ± 0.7	13.0 ± 5.5	89.9 ± 20.7
糖尿病性網膜症+腎症II期 (DNII)	12	9:3	59.5 ± 9.2	121.5 ± 67.5	6.9 ± 0.9	14.8 ± 9.1	65.8 ± 28.4
糖尿病性網膜症+腎症III期 (DNIII)	6	4:2	63.3 ± 1.8	1016.7 ± 786.9	6.2 ± 1.0	11.8 ± 11.9	63.23 ± 22.9

Alb/IgG 除去済み尿タンパク質は、speed vac で乾燥させた後、界面活性剤である 12 mM SDC (sodium deoxycholate), 12 mM SLS (sodium N-lauroylsarcosinate) in 100 mM Tris-HCl (pH8.8)で溶解し、95°C 5 min 熱変性させた。次にあらかじめサンプルを 5 倍希釈し、酵素：タンパク質の質量比が 1:50 になるように Lys-C (Lysyl Endopeptidase, mass spectrometry grade, Wako) in 50 mM Tris-HCl (pH8.8)を加えて 37°Cで 4 時間消化した。さらに、Trypsin の活性を高めるために CaCl₂ を終濃度 2 mM になるように加え、酵素：タンパク質の質量比が 1:50 になるように Trypsin (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega)を加えて 37°C で over night 消化した。次に還元アルキル化のため、終濃度 10 mM になるように DTT を加えて 37°Cで 1 時間、終濃度 40 mM になるようにヨードアセトアミドを加えて暗所室温で 1 時間反応させ、終濃度 40 mM になるように DTT を加えてアルキル化の反応を止めた。尿タンパク質の溶解に使用した界面活性剤を除去するため、PTS (Phase Transfer Surfactant)法を用いた。PTS 法は、当量の Ethyl Acetate を加え、終濃度 0.5% TFA を加えて混ぜて遠心した。界面活性剤が上清に移行するため除去した。得られた尿ペプチドは、脱塩濃縮のために Mono Spin C18 で精製し、得られたペプチドの濃度は BCA assay (PIERCE)で測定した。

3. iTRAQ 法を用いたプロテオーム解析

探索用の尿検体から得られたペプチドは、定量比較をするために iTRAQ 法による解析を行った。iTRAQ とは、AB Sciex 社の質量分析装置で定量をするための製品で、比較したいサンプル由来のペプチドに 4 種類 (4 plex)、あるいは 8 種類 (8 plex)の同位体を標識して一つに混ぜ合わせ、質量分析装置で解析することにより、MS/MS 解析からペプチド配列情報、同位体標識したレポーターイオンの比から定量情報が得られる方法である。

今回は 4 群の比較のため、iTRAQ-4 plex を用いて実験した。健常者(H)を 114、糖尿病で腎症なし(DN-I)を 115、微量アルブミン尿(DN-II)を 116、マクロアルブミン尿(DN-III)を 117 の同位体で標識して、一つに混ぜ合わせた。混ぜ合わせたペプチドは、同定数を上げるために SCX (強陽イオン交換) クロマトグラフィーによる分画を行った。

SCX クロマトグラフィーに用いた HPLC は GILSON、カラムは TSKgel SP-2SW 4.6mm x 25cm (TOSOH)、溶媒は A: 5 mM KH₂PO₄, 25% acetonitrile、B: 5 mM KH₂PO₄, 500 mM KCl, 25% acetonitrile、グラジエントは 0-10min で 0% B buffer、10-70min で 100%、70-90min で 100%、90-100min で 0%とし、流速 0.7 ml/min で流し、検出は 214nm, 280nm で行った。溶出したペプチドは、2 分間隔で 50 分画し、各フラクションは speed

vac で acetonitrile を飛ばした後、GL-Tip SDB (C18)で精製した。

ピークの少ないフラクションはまとめて、30分画にして、ペプチドサンプルを nanoLC (Paradigm MS4, C18 カラム) -MS/MS (QSTAR-Elite) にアプライしてペプチドを測定し、スペクトルデータを Protein Pilot と Mascot によりデータベース検索し、タンパク質の同定と定量の解析を行った。

4. MRM 法による定量解析

iTRAQ 解析で変動があったタンパク質について、多検体を用いた検証をするために MRM 法による定量解析を行った。

iTRAQ 解析や尿ショットガンプロテオーム解析により得られたデータをもとに、MRM Pilot という transition 設定用ソフトを用いて、各ペプチドの transition を設定し (Table 4)、尿サンプル (健常者、糖尿病患者検体) を用いて検出できる transition かどうか確認した。また、同時に MS/MS 解析もできる EPI の method を組んで、mascot 検索により同定ができ、retention time も確認できるものに関しては、測定可能とし、それ以外のペプチドに関しては、検出できるものについて、同一タンパク質で複数の transition が組めたものに関しては変動が一致するかどうかを確認し、ピークが高く検出できるものを確

認用のペプチドを購入して確認した。

検証用の検体は、それぞれ個別に処理した後、BCA assay にてペプチド量を測定し、1 run あたり 500ng ずつ、さらに同時に run 間の補正用に、aqua peptide を 30 fmol ずつを加えアプライした。

nanoLC や 4000QTRAP の状態は、BSA-MRM を測定することによって確認し、測定に問題ないことを確認した。

測定後は、MultiQuant という定量用のソフトウェアで各ペプチドと transition のピークを選び、area を求めて aqua peptide の area で補正した。

C. 研究結果

まず、腎症の各ステージの変動タンパク質を選出するために、健常者(H)、糖尿病で腎症なし(DN-I)、微量アルブミン尿(DN-II)、マクロアルブミン尿(DN-III)の4群で、4名ずつのサンプルをプールして、ステージ毎に4種類の iTRAQ 試薬で標識したサンプルを nanoLC/MSMS で解析した。得られたスペクトルデータは、Protein Pilot と Mascot で解析し、タンパク質の同定と定量解析を行った。

尿検体の変性に、SDC/SLS という界面活性剤を使用することにより、次の Lys-C/Trypsin 酵素の活性を阻害することなく、逆に活性を高めることを確認し、同定数が格段に増加した。また、通常還元アルキル化を行ってから、Trypsin 消化を行うが、還元アルキル化に使用する DTT やヨードアセトアミドの影響により Trypsin の活性が低下してしまうため、Lys-C/Trypsin 消化後に還元アルキル化をすることにより、消化効率を高めることができることを確認し、

その後さらに Lys-C/Trypsin 消化しても、同定数が上がらないため、十分に消化されていることを確認した。

iTRAQ ラベルしたサンプルは、SCX で30分画して nanoLC/MSMS することにより、3倍ほど同定数が増加することから、よりたくさんの候補タンパク質の情報を得ることができる。今回同定できたタンパク質数は、全体で1050タンパク質であった。

定量情報は、同定されたほとんどのタンパク質で得られたが、有意な変動をとらえるために、 $P < 0.05$ のものに絞り込み、その中でそれぞれのステージで比較して2倍以上変動したタンパク質に絞り込んだ (Figure 2)。健常者と比較して2倍以上変動したタンパク質について各ステージ間での数についてはベン図 (Figure 3) に示した。

SCXカラムによるペプチド分画

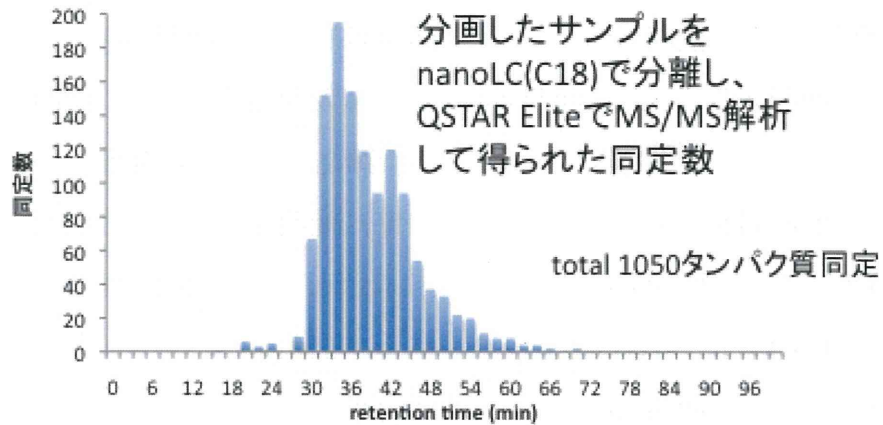
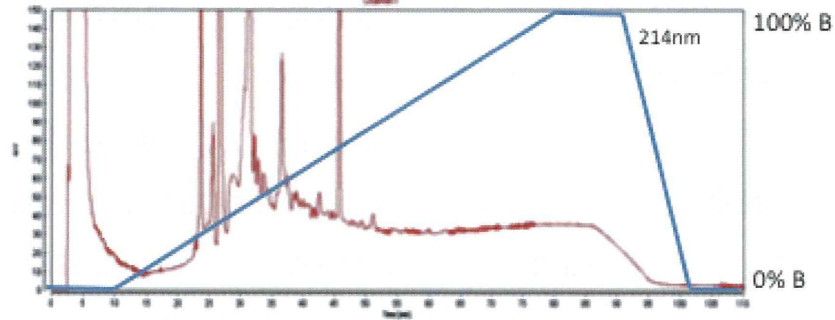


Figure 1: ペプチドを SCX 分画して nanoLC/MSMS 解析により得られたタンパク質同定数

減少/増加	H	DN-I	DN-II	DN-III
H		25	27	29
DN-I	8		8	15
DN-II	7	0		13
DN-III	8	1	1	

Figure 2: 2倍以上変動($P < 0.05$)のあったタンパク質数

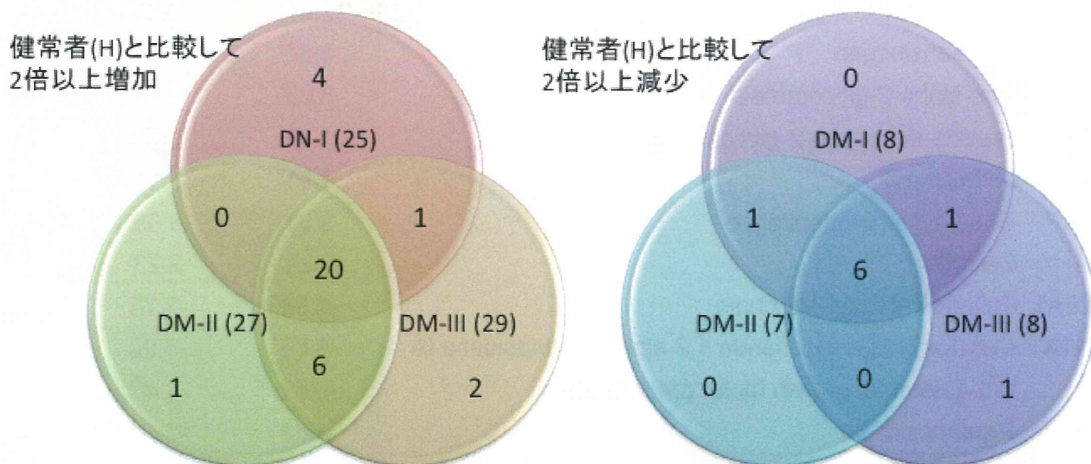


Figure 3: 健常者と比較して2倍以上変動したタンパク質数

iTRAQ 法にて H vs DN3 で 2 倍以上変動したタンパク質 37 個のうち、腎臓で発現しているものなどから優先的に MRM 測定用 transition を設定し、測定することができたタンパク質 15 個 (Table 3) について、健常者 (H: 8 名)、糖尿病で合併症なし (DNI: 7 名)、糖尿病性網膜症かつ腎症 II 期 (DNII: 12 名)、糖尿病性網膜症かつ腎症 III 期 (DNIII: 6 名) の 4 群、33 名分の検体で検証した。(Figure 4, Figure 5)

MRM 法は、測定したいタンパク質特有のペプチドの親イオンの m/z (Q1) とフラグメントイオンの m/z (Q3) の値を設定して測定する (Table 4) ことにより、これら 15 種類やそれ以上の数十種類のタンパク

質の定量を 1 回の解析で測定できる特徴がある。

MRM 法による検証の結果 (Table 5)、既に糖尿病性腎症で変動することが報告されているタンパク質に関して、同様の傾向を示すことができたことから、本手法による解析は糖尿病性腎症のバイオマーカー探索に有効なものであることが分かった。また、報告のない 4 種類のタンパク質でも有意に変動するものがあつたため、新しいバイオマーカータンパク質である可能性が示された。

Table 3: MRM 測定タンパク質リスト

数値: iTRAQ 法による変動結果、黄色: 2 倍以上増加、水色: 2 倍以上減少

GN	Protein Name	H vs DN1	H vs DN2	H vs DN3
TF	Serotransferrin	2.88	5.77	29.49
CP	Ceruloplasmin	2.73	2.97	19.43
AFM	Afamin	2.67	5.95	19.25
AGT	Angiotensinogen	3.64	3.42	9.63
AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	3.03	5.37	7.39
LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1.95	2.61	5.60
CTSZ	Cathepsin Z	1.91	2.17	3.13
ENPEP	Glutamyl aminopeptidase	3.31	3.59	2.86
GSN	Gelsolin	2.22	2.23	2.29
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	-1.88	-1.73	-2.36
MAN1A1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	-4.86	-3.90	-3.71
EGF	pro-epidermal growth factor preproprotein	-2.41	-2.47	-3.91
PSAP	Prosaposin	-6.62	-2.98	-4.76
RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	-5.09	-3.25	-5.65
KLK1	Kallikrein-1	-5.62	-6.58	-6.09

Table4: MRMパラメーター

ID	UniProt accession no.	UNIPROT ID	Peptide Sequence	Charge	Fragment Ion	Q1	Q3	Retention Time	DP	EP	CE	CXP
Serotransferrin	P02787	TRFE_HUMAN	EGYYGYTGAFR	2	y7	642.27	771.38	40.1	70	10	33	15
					y8	642.27	934.44	40.1	70	10	33	15
					y5	642.27	551.29	40.1	70	10	33.26	15
Ceruloplasmin	P00450	CERU_HUMAN	EYTDASFTNR	2	y5	602.3	624.3	26.6	70	10	29	15
					y4	602.3	911.4	26.6	70	10	29	15
Afamin	P43652	AFAM_HUMAN	DADPDTFFAK	2	y7	563.8	825.4	40.1	70	10	24	15
Angiotensinogen	P01019	ANGT_HUMAN	ALQDQLVLVAAK	2	y7 ²⁺	563.8	413.2	40.1	70	10	23	15
					y9	634.9	956.6	43.7	70	10	29	15
Zinc-alpha2-glycoprotein	P25311	ZA2G_HUMAN	EIPAWVPFDPAAQITK	2	y10 ²⁺	634.9	542.8	43.7	70	10	29	15
					y10	892.0	1087.6	59.5	70	10	40	15
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750	A2GL_HUMAN	VAAGAFQGLR	2	y14 ²⁺	892.0	770.9	59.5	70	10	35	15
					y7	495.27	748.41	32.7	70	10	27	15
Cathepsin Z	Q9UBR2	CATZ_HUMAN	NVDGVNYASITR	2	y8	495.27	819.45	32.7	70	10	27	15
					y7	654.81	824.43	33.4	70	10	34	15
Glutamyl aminopeptidase	Q07075	AMPE_HUMAN	ASLIDDAFALAR	2	y9	654.81	980.52	33.4	70	10	34	15
					y10	654.81	1095.54	33.4	70	10	34	15
					y8	631.83	878.44	61.3	70	10	33	15
Gelsolin	P06396	GELS_HUMAN	TGAQELLR	2	y9	631.83	991.52	61.3	70	10	33	15
					y7	631.83	763.41	61.3	70	10	33	15
Collagen alpha-1(VI) chain	P12109	CO6A1_HUMAN	FLTAGR	2	b2	444.3	159.1	27	70	10	28	15
					y4	444.3	530.3	27	70	10	25	15
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	P33908	MA1A1_HUMAN	FDGGVEAIATR	2	y5	332.69	517.31	20.1	70	10	19.638	15
					b2	332.69	261.16	20.1	70	10	19.638	15
					y4	332.69	404.23	20.1	70	10	19.638	15
Pro-epidermal growth factor	P01133	EGF_HUMAN	PSSLVVVHPLAK	3	y9	568.29	873.48	33.1	70	10	36	15
					y6	568.29	660.37	33.1	70	10	36	15
Proactivator polypeptide	P07602	SAP_HUMAN	LVGYLDR	2	y5	568.29	531.32	33.1	70	10	30.005	15
					y4	416.26	428.29	31.7	70	10	33	15
					b5	416.26	484.28	31.7	70	10	33	15
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62979	RS27A_HUMAN	ESTLHLVLR	3	b4	416.26	385.21	31.7	70	10	33	15
					y6	418.24	722.38	30.7	70	10	30	15
Kallikrein-1	P06870	KLK1_HUMAN	VLSYVK	2	y5	418.24	623.31	30.7	70	10	30	15
					y4	418.24	566.29	30.7	70	10	30	15
					y4	356.55	500.36	35.4	70	10	27	15
					y5	356.55	637.41	35.4	70	10	27	15
					y4	354.72	496.28	22.4	70	10	30	15
					y3	354.72	409.24	22.4	70	10	30	15
					y5	354.72	609.36	22.4	70	10	30	15

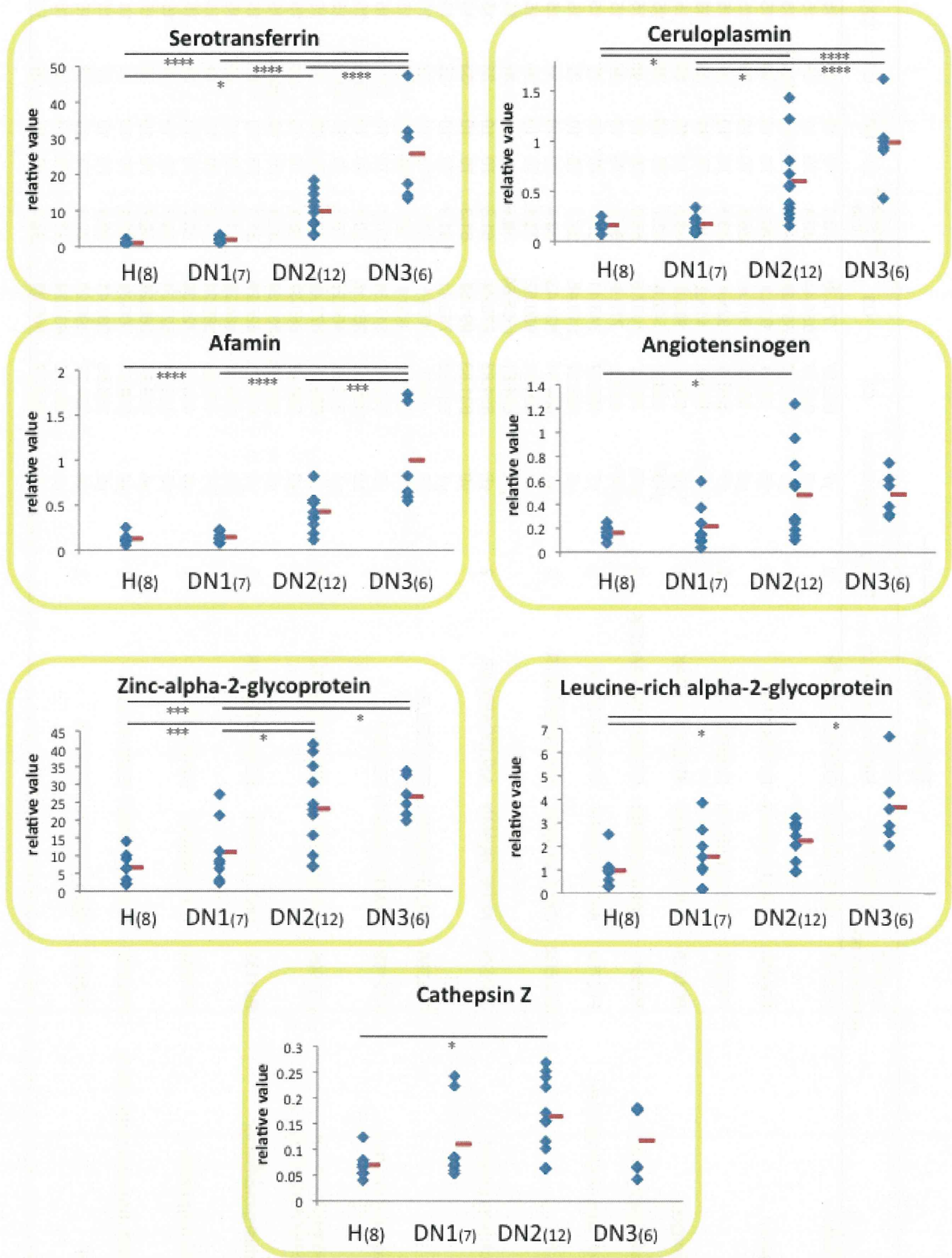


Figure 4: MRM 法による検証の結果、腎症の悪化に応じて増加したタンパク質

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$

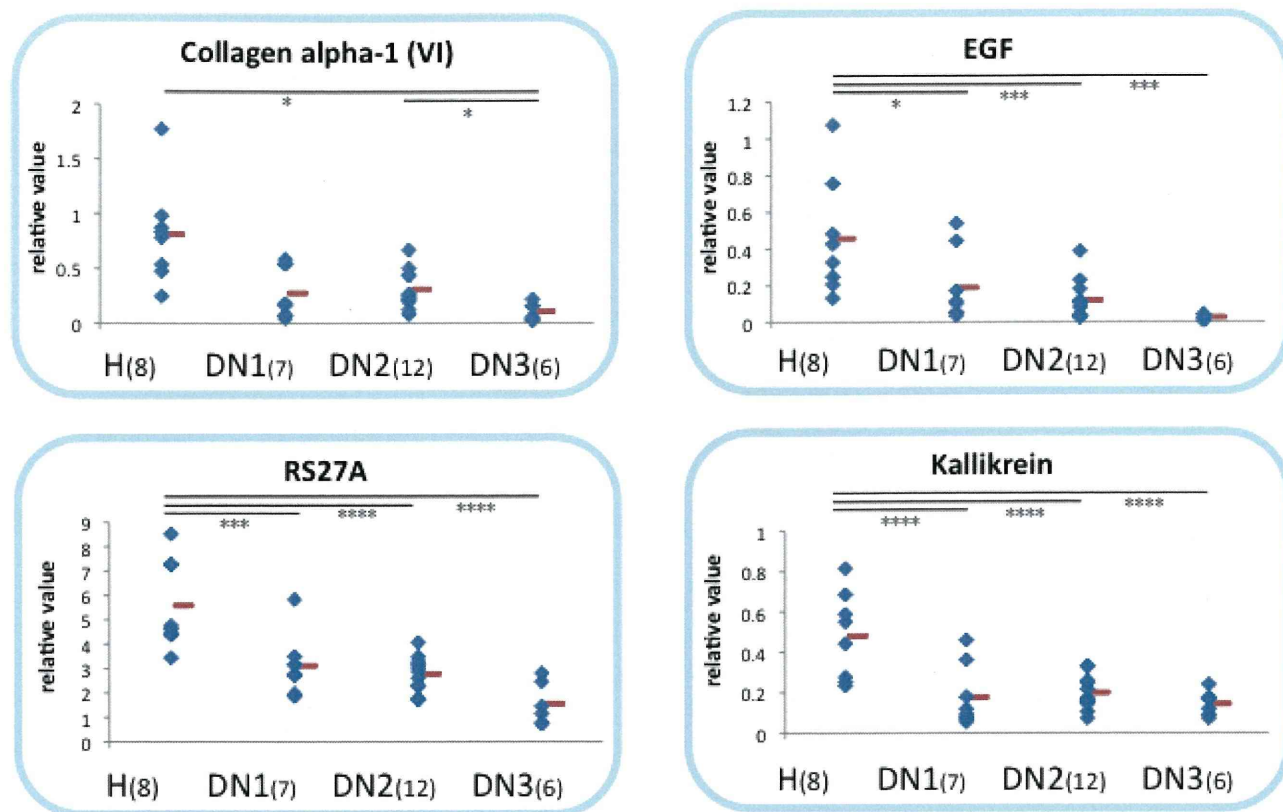


Figure 5: MRM 法による検証の結果、腎症の悪化に応じて減少したタンパク質

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$

Table 5: MRM 測定による検証の結果有意差のあったタンパク質と既報の情報

Protein Name	傾向	既報
Serotransferrin	増加	一致
Ceruloplasmin	増加	一致
Afamin	増加	一致
Angiotensinogen	増加	一致
Zinc-alpha-2-glycoprotein	増加	一致
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	増加	なし
Cathepsin Z	増加	なし
Collagen alpha-1(VI) chain	減少	なし
Pro-epidermal growth factor	減少	一致
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	減少	なし
Kallikrein-1	減少	一致

D. 考察

糖尿病によって引き起こされる合併症の中でも、糖尿病性腎症のバイオマーカーを探索するために、尿プロテオーム解析を行った。

ステージの異なる糖尿病性腎症患者尿や健常者尿をプロテオーム解析したところ、約 1000 個のタンパク質を同定した。この同定数は、尿のショットガンプロテオーム解析の既報と比較しても十分な数が得られた。糖尿病性腎症ステージごとの iTRAQ 解析により、健常者と比較して糖尿病性腎症 III 期で増加するタンパク質を 29 個、減少するタンパク質を 8 個検出することができ、この中の多くは、腎症が悪化するほどより量が増減するものであった。

変動のあったタンパク質 37 個について、多検体での検証をするために、スループットの高い MRM 解析を行ったところ、糖尿病性腎症ステージごとで有意に変動するタンパク質が 11 個見つかった。既報で、腎症のバイオマーカーと言われているタンパク質とも一致することから、本手法による解析は糖尿病性腎症のバイオマーカー探索に有効なものであることが分かった。また、今回測定ができなかったターゲットタンパク質に関しても、transition 作成をすることによって種類を増やすことが可能であるため、増やしていきたいと考えている。

今回新たに変動がみられた 4 種類のタ

ンパク質は、新しい糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる可能性があり、今後、検体数を増やすことにより検証を進め、新規バイオマーカーとしての有効性を検証したい。

E. 結論

糖尿病性腎症の新しいバイオマーカー候補タンパク質を 4 種類同定することができた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

学会発表：2011 年 12 月 3 日 第 23 回糖尿病性腎症研究会 口頭発表 「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」○佐藤 恵美、加納 圭子、久保田 浩之、鏑木 康志

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shim JH, Greenblatt MB, Singh A, Brady N, Hu D, Drapp R, Ogawa W, Kasuga M, Noda T, Yang SH, Lee SK, Rebel VI, Gitlincher 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.	122	91-106	2012
Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kido Y, Hosooka T, Asahara SI, Matsuda T, Ota T, Watanabe H, Saito Y, Miyamoto K, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H.	Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits STAT3-Dependent Suppression of Hepatic Gluconeogenesis via Dephosphorylation and Deacetylation.	Diabetes	61	61-73	2012
Tawaramoto K, Kotani K, Hashiramoto M, Kandada Y, Nagare T, Sakaue H, Otagawa 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.	26	95-109	2012
Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fughita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seno S, Kasuga M, Kido Y.	Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1.	PLoS One.	6	e23238	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Kasuga M.</u>	Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion.	J Biol Chem.	286	37458-37469	2011
Li S, Ogawa W, Emi A, Hayashi K, Senga Y, Nomura K, Harada K, Yu D, <u>Kasuga M.</u>	Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver.	Biochem Biophys Res Commun.	412	197-202	2011
Cao Y, Nakata M, Okamoto S, Takano 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, <u>Kasuga M.</u> , Nakae J.	PDK1-Foxo1 in agouti-related peptide neurons regulates energy homeostasis by modulating food intake and energy expenditure.	PLoS One.	6	e18324	2011
Seike M, Saitou T, Kouchi Y, Ohara T, Matsuhisa M, Sakaguchi K, Tomita K, Kosugi K, Kashiwagi A, <u>Kasuga M.</u> , Tomita A, Naito Y, Nakajima H.	Computational assessment of insulin secretion and insulin sensitivity from 2-h oral glucose tolerance tests for clinical use in type 2 diabetes.	J Physiol Sci.	61	321-330	2011
Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasaki T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, <u>Kasuga M.</u> , Kadowaki T.	Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway.	Cell Metab.	13	401-412	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsujimoto T, Kaji H, Takahashi Y, Kishimoto M, Noto H, Yamamoto-Honda R, Kamimura M, Morooka M, Kubota K, Shimbo T, Hiroe M, <u>Noda M.</u>	Asymptomatic coronary heart disease in patients with type 2 diabetes with vascular complications: a cross-sectional study.	BMJ Open.	1	e000139	2011
Ikeda N, Saito E, Kondo N, Inoue M, Ikeda S, Satoh T, Wada K, Stickley A, Katanoda K, Mizoue T, <u>Noda M.</u> , Iso H, Fujino Y, Sobue T, Tsugane S, Naghavi M, Ezzati M, Shibuya K.	What has made the population of Japan healthy?	Lancet	378	1094-1105	2011
Nanri A, Mizoue T, <u>Noda M.</u> , Takahashi Y, Matsushita Y, Poudel-Tandukar K, Kato M, Obayashi 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.	94	884-891	2011
Tanaka T, Morita A, Kato M, Hirai T, Mizoue T, Terauchi Y, Watanabe S, <u>Noda M.</u> ; SCOP Study Group.	Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP).	Endocr J.	58	589-596	2011
Noto H, Tsujimoto T, Sasazuki T, <u>Noda M.</u>	Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis.	Endocr Pract.	17	616-628	2011
Goto M, Yamamoto-Honda R, Shimbo T, Goto A, Terauchi Y, Kanazawa Y, <u>Noda M.</u>	Correlation between baseline serum 1,5-anhydroglucitol levels and 2-hour post-challenge glucose levels during oral glucose tolerance tests.	Endocr J.	58	13-17	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashino Y, Suzuki H, Yamazaki K, Izumi K, <u>Noda M</u> , Kobayashi M.	Depressive symptoms, not completing a depression screening questionnaires, and risk of poor compliance with regular primary care visits in patients with type 2 diabetes: the Japan Diabetes Outcome Intervention Trial 2 (J-DOIT2) study group.	Exp Clin Endocrinol Diabetes	119	276-280	2011
Nanri A, Mizoue T, Takahashi Y, Matsushita Y, <u>Noda M</u> , Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group.	Association of weight change in different periods of indulgence with risk of type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-Based Prospective Study.	J Epidemiol Community Health	65	1104-1110	2011
Matsushita Y, Nakagawa T, Yamamoto S, Takahashi Y, <u>Noda M</u> , Mizoue T.	Associations of smoking cessation with visceral fat area and prevalence of metabolic syndrome in men: the Hitachi health study.	Obesity	19	647-651	2011
Tanaka T, Sakurada S, Kano	Identification of tuberculosis-associated	BMC Infect Dis	11	71	2011
<u>Kaburagi Y</u> , Unoki-Kubota H.	Role of the podocyte signal-transduction systems in the pathogenesis of diabetic nephropathy.	Diabetologia	2	160-161	2011

IV. その他（総説など）

Role of the podocyte signal-transduction systems in the pathogenesis of diabetic nephropathy

Yasushi Kaburagi · Hiroyuki Unoki-Kubota

Received: 19 October 2011 / Published online: 12 November 2011
© The Japan Diabetes Society 2011

Diabetic nephropathy, which develops in 30–40% of diabetic patients, is a leading cause of end-stage renal disease (ESRD), accounting for more than 40% of new ESRD cases undergoing treatment in the USA and other developed countries [1, 2]. In its initial stage, diabetic patients excrete macromolecules such as albumin, indicating an abnormality in the glomerular permeability barrier, followed by a gradual decline of GFR with the appearance of overt proteinuria [3]. The glomerular permeability barrier consists of endothelial cells, the glomerular basement membrane, and podocytes. Podocytes are highly specialized epithelial cells with interdigitating foot processes that participate in the prevention of proteinuria [4]. In the early stage of diabetic nephropathy, effacement of the foot processes is observed in podocytes, resulting in the leakage of macromolecules, including albumin, into the urine [4]. Loss of trace amounts of albumin in the urine, microalbuminuria, has been regarded as an early marker of diabetic nephropathy, although microalbuminuria is also observed in patients with metabolic syndrome, indicating that insulin resistance may cause podocyte injury [5].

To examine the role of podocyte insulin signaling in the pathogenesis of diabetic nephropathy, Welsh et al. [6] recently analyzed mice with podocyte-specific deletion of the insulin receptor. They showed that these mice developed significant proteinuria by 5 weeks of age; histological

glomerular changes resembling those of diabetic nephropathy, for example effacement of podocyte foot processes, thickening of the basement membrane, accumulation of mesangial matrix, and glomerulosclerosis in a normoglycemic environment, were also observed. In in-vivo and in-vitro analysis of podocytes lacking the insulin receptor, both the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways, the two major pathways downstream of the insulin receptor, were shown to be abrogated. It was also reported that insulin-induced reorganization of actin cytoskeleton in podocytes, which, in investigations of familial nephritic syndromes, was revealed to be important in the maintenance of the glomerular permeability barrier [7], was affected by the absence of the insulin receptor. These findings suggested that impaired insulin signaling in podocytes is sufficient for development of some pathological features of diabetic nephropathy, although its molecular mechanism was not fully investigated. In addition, in these mice, the role of other insulin-regulated pathways important for the maintenance of podocyte function, such as autophagy and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways were not evaluated [8, 9].

Autophagy is a biological process that plays a crucial role in maintaining cell integrity by degradation and recycling of cytosolic proteins and organelles [8]. As podocytes are terminally differentiated postmitotic cells, autophagy is critically important for maintenance of cellular homeostasis. In fact, podocyte-specific deletion of autophagy-related 5 (Atg5), a key regulator of the autophagic process, led to a glomerulopathy in aging mice that was accompanied by accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins, ER stress, and proteinuria [10]. This autophagic pathway is inhibited by insulin, and by other growth factors and nutrients, for example

Y. Kaburagi (✉) · H. Unoki-Kubota
Department of Diabetic Complications,
Diabetes Research Center, Research Institute,
National Center for Global Health and Medicine,
1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan
e-mail: kaburagi@ri.ncgm.go.jp

glucose and amino acids, via a rapamycin-sensitive protein complex, termed mTOR complex 1 (mTORC1), containing an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase, mTOR [9]. Animal studies have revealed that experimental inhibition of mTORC1 activity upregulated in diabetic state via rapamycin has a beneficial effect on the treatment of diabetic nephropathy [11]. According to these findings, Inoki et al. [12] recently generated mice with podocyte-specific ablation of an upstream negative regulator of mTORC1, TSC1, to analyze the effects of constitutive mTORC1 activation on glomerular function. Podocyte-specific mTORC1 activation caused thickening of the glomerular basement membrane, proteinuria, and mesangial expansion, in addition to podocyte loss. These diabetic nephropathy-like features were ameliorated by rapamycin treatment or genetic suppression of mTORC1 activity by podocyte-specific knockout of Raptor, an essential component of mTORC1 [12]. Conversely, Gödel [13] analyzed mice lacking podocyte mTORC1 activity by podocyte-specific knockout of Raptor, and demonstrated that loss of podocyte mTORC1 activity also caused albuminuria and progressive glomerulosclerosis. They also showed that additional loss of podocyte mTORC2 activity by podocyte-specific knockout of Rictor, an essential component of mTORC2, aggravated the glomerular lesions, indicating that both of the two mTOR complexes are involved in the maintenance of podocyte function [13]. These studies convincingly showed that podocyte mTOR activity is essential to the maintenance of glomerular function, although the extent to which these mTOR pathways are involved in the pathogenesis of nephropathy in diabetic patients remains unclear. Moreover, taking into account that patients with tuberous sclerosis caused by TSC1 or TSC2 mutations do not develop glomerular lesions resembling those of diabetic nephropathy [14], these findings in animal models should be cautiously examined for future clinical applications in the treatment of diabetic nephropathy.

Collectively, recent animal studies manipulating podocyte insulin-regulated signal transduction have verified that perturbation of this system in podocytes is sufficient to cause development of pathological changes similar to those of diabetic nephropathy. Further investigation is needed to clarify the molecular mechanisms of human diabetic nephropathy.

References

1. Stewart JH, McCredie MR, Williams SM, Jager KJ, Trpeski L, McDonald SP. ESRD Incidence Study Group. Trends in incidence of treated end-stage renal disease, overall and by primary renal disease, in persons aged 20–64 years in Europe, Canada and the Asia-Pacific region, 1998–2002. *Nephrology*. 2007;12:520–7.
2. Centers for Disease Control, Prevention (CDC). Racial differences in trends of end-stage renal disease, by primary diagnosis—United States, 1994–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007;56:253–6.
3. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007;27:195–207.
4. Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and haemodynamic factors in podocyte injury in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27:207–15.
5. Ninomiya T, Kiyohara Y. Albuminuria and chronic kidney disease in association with the metabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 2007;2:104–7.
6. Welsh GL, Hale LJ, Eremina V, Jeansson M, Maezawa Y, Lennon R, Pons DA, Owen RJ, Satchell SC, Miles MJ, Caunt CJ, McArdle CA, Pavenstädt H, Tavaré JM, Herzenberg AM, Kahn CR, Mathieson PW, Quaggin SE, Saleem MA, Coward RJ. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab*. 2010;12:329–40.
7. Zenker M, Machuca E, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier. *J Mol Med*. 2009;87:849–57.
8. Weide T, Huber TB. Implications of autophagy for glomerular aging and disease. *Cell Tissue Res*. 2011;343:467–73.
9. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124:471–84.
10. Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, Wiech T, Grahammer F, Arnold SJ, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Mizushima N, Shaw AS, Walz G, Huber TB. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest*. 2010;120:1084–96.
11. Huber TB, Walz G, Kuehn EW. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kid Int*. 2011;79:502–11.
12. Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan KL. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2181–96.
13. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, Debreczeni-Mór A, Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Hartleben G, Wiech T, Fornoni A, Nelson RG, Kretzler M, Wanke R, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Cohen CD, Hall MN, Rüegg MA, Inoki K, Walz G, Huber TB. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2197–209.
14. Siroky BJ, Yin H, Bissler JJ. Clinical and molecular insights into tuberous sclerosis complex renal disease. *Pediatr Nephrol*. 2011;26:839–52.

Diabetes Frontier

別刷

メディカルレビュー社

〒541-0045 大阪市中央区道修町1-5-18 朝日生命道修町ビル TEL 06-6223-1469 FAX 06-6223-1245