



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

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

鏑木 康志

Yasushi Kaburagi

Key Words

糖尿病
細小血管症
プロテオミクス
バイオマーカー
質量分析

はじめに

糖尿病は国内外で急増しており、国際糖尿病連合 (IDF) の 2010 年の発表によると世界の糖尿病有病数は 2 億 8,500 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 3,800 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増しており、厚生労働省の 2007 年国民健康・栄養調査では糖尿病有病者は 890 万人と 5 年前の調査と比較して 20% 以上も増加しており、また糖尿病予備軍 [HbA1c (JDS 値) 5.6% 以上] を含めると 2,210 万人と 5 年前との比較では 30% 以上の増加となっている。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、2009 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約 1 万 6,400 人と透析導入原因疾患の 44.5% を占

め、糖尿病網膜症からの失明患者は年間 3,000 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、糖尿病性合併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。これらの合併症は進行するまで自覚症状を伴わないため、糖尿病合併症の病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断可能な診断指標 (バイオマーカー) が開発できれば、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。本稿では、プロテオミクスの手法を用いた糖尿病診断マーカー、特に糖尿病合併症マーカーの探索研究の現状および今後の方向性について概説する。

I 糖尿病とバイオマーカー

バイオマーカーとは尿や血清などの生体試料中にある物質で、生体内の生物学的あるいは病理学的プロセスを定量

的に評価可能な指標である。また、疾患治療におけるエンドポイントである患者の死亡、疾患によるイベントなどの発生可能なバイオマーカーはサロゲート(代用)マーカーと呼ばれ、有用なサロゲートマーカーを用いれば臨床試験にかかる時間および費用を節約することが可能となるため、その開発には大きな意義がある¹⁾²⁾。

糖尿病の診療においては、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。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合併症の発症およ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すでに明らかになっている³⁾⁴⁾。ところが、個々の患者において糖尿病合併症の有無あるいは進行するか否かを予測可能な血清あるいは尿マーカーは現時点では存在しない。たとえば、糖尿病性腎症では微量アルブミン尿が腎症の病期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型および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⁵⁾⁶⁾。

II 糖尿病合併症の組織サンプルでのプロテオーム解析

このため、糖尿病合併症の診断マーカーとなりうる蛋白をプロテオーム解析の手法を用いて探索することは有意義であると考えられる。そのためには、まず合併症の場となる組織(腎臓、網膜、神経、血管など)がプロテオーム解析の対象となる。たとえば、糖尿病性腎症については新潟大学のYoshidaらが、手術時に摘出した腎臓をミンチした後、ふるい操作にかけて糸球体を単離し、SDS-PAGE後に切り出したバンドから高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)にて解析し、2966遺伝子由来する6,686個の蛋白を同定している⁷⁾。また、この研究グループは腎生検の組織切片からlaser microdissectionにより糸球体を採取し、高感度の二次元電気泳動法により糸球体由来蛋白の定量解析を可能とする実験系を確立している⁸⁾。これらの解析が糖尿病性腎症の診断あるいは治療に有用な蛋白の発見につながる可能性

がある。

また、糖尿病網膜症については、患者からの合併症の場となる網膜の採取が不可能なため、増殖網膜症に対する硝子体手術時に採取される硝子体を用いたプロテオーム解析が行われている⁹⁾⁻¹¹⁾。最近の分析結果では、電気泳動あるいは多次元クロマトグラフィにて分画したサンプルをLC-MSにて解析することによって、500個程度の蛋白が増殖網膜症の硝子体サンプルから同定されており¹⁰⁾、これらの蛋白から増殖網膜症の新しい診断法が確立されることが期待される。

III 糖尿病合併症の血清・血漿のプロテオーム解析の問題点およびその克服のためのアプローチ

血液は糖尿病診療の現場で日常的に採取されるため、血清・血漿はバイオマーカー探索のための第一の研究対象となる。ところが、糖尿病は全身疾患であるため、同定された血清蛋白の変動がどの臓器あるいは組織のどのような病態に起因するかを特定するのは困難である。また、糖尿病では比較的早期から動脈硬化が起こり、特に糖尿病性腎症を合併した糖尿病患者では腎症の進行に伴って心血管疾患による死亡率が高まることが報告されている¹²⁾。このため、単純に糖尿病性腎症患者の血液サンプルからプロテオーム解析を行っても、腎症の指標となる血液マーカーを発見するのは困難である¹³⁾⁻¹⁵⁾。

近年、あらかじめ判明しているバイオマーカー候補蛋白について質量分析器を用いて高感度で特異的に定量できるselected reaction monitoring (SRM)/multiple reaction monitoring (MRM)法による解析が使われるようになってきた¹⁶⁾¹⁷⁾。このSRM/MRM法の原理は図1に示すように、測定対象の蛋白試料をトリプシン消化して、液体クロマトグラフィにオンラインで接続した三連四十極型質量分析器(triple quadrupole mass spectrometer)で分析する。ペプチドを順次イオン化させて、Q1にて特定の質量をもつ親イオンのみを通過させ、選択した親イオンをQ2で限定的に破壊して断片化させて娘イオンを作り、Q3で断片化された特定の質量の娘イオンを定量する。定量する蛋白のQ1とQ3の2回の質量フィルターによって、非常に高いS/N比で選択性高く測定すること

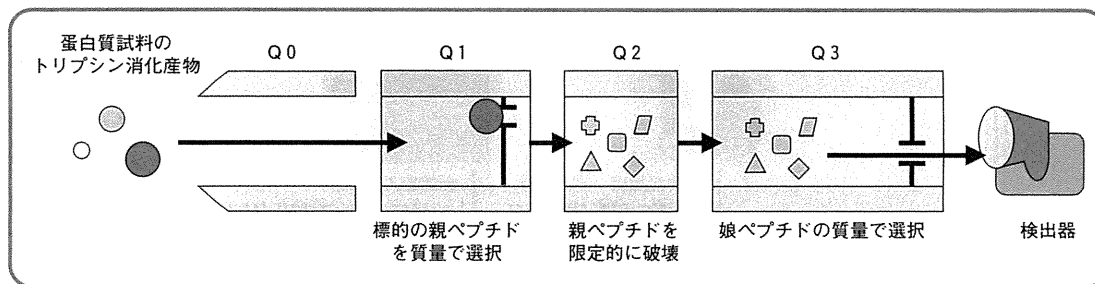


図1. MRM測定原理

が可能である。本法を用いて糖尿病患者検体にて解析した研究はまだわずかだが、Kimらは糖尿病網膜症患者の硝子体サンプルにて有意に変動した12個の蛋白について、患者血漿にてSRM/MRM法にて定量している¹⁸⁾。このSRM/MRM法を用いたアプローチでは、糖尿病患者の組織検体、疾患モデル動物、あるいは培養細胞にて糖尿病合併症との関連性が、前もって検証済みのバイオマーカー候補蛋白を糖尿病患者由来検体にて定量評価することが可能であるため、患者血清・血漿を網羅的に解析する場合と比較して、糖尿病合併症マーカーの探索および検証が効率化されることが期待される。

また、SRM/MRM法のもう1つの利点として、一度に多数のダブルフィルターを組むことができるので、血清・血漿のような複雑なサンプルであっても、一度に多数の蛋白の定量解析を行うこと可能である。近年、種々の疾患において単一のバイオマーカーによる病態把握には限界があるため、いくつものバイオマーカーを組み合わせたマルチマーカーの使用が提唱されている¹⁹⁾。一斉分析が可能なMRM法は、この点でも大きく力を発揮する可能性がある。

IV 糖尿病患者尿の プロテオーム/ペプチドーム解析

尿蛋白の約70%が腎臓あるいは尿路に由来するとされている²⁰⁾。このため、腎臓における障害は尿中の蛋白あるいはペプチドのプロファイルに影響を与えられ、尿のプロテオームあるいはペプチドーム解析は腎症マーカー探索の有力な手段となっている。数年前までは、二次元電

気泳動に質量分析を組み合わせた解析法が尿プロテオーム解析の主要な手段であったが、二次元ゲル上で解析可能な蛋白スポットは数100に過ぎず、また解析に多大な労力および時間がかかる短所があった²⁰⁾²¹⁾。近年、よりハイスループットに蛋白の同定および定量を行うシステムとして、尿蛋白のトリプシン消化物を液体クロマトグラフィに直結した質量分析計(LC-MS)が用いられており、尿サンプルから2,000個以上の蛋白の同定が可能となっている²²⁾。また、トリプシン消化を行わなくても10kDa以下のペプチドはキャピラリー電気泳動装置あるいは液体クロマトグラフィに質量分析計を組み合わせたシステム(CE-MSまたはLC-MS)にて解析可能であり、Merchantらの報告²³⁾では、1型糖尿病患者で早期の腎機能障害で低下する尿中の3個のペプチドを見出ししている。最近、多施設共同研究²⁴⁾にてCE-MSやLC-MSにて同定される尿ペプチド約5,000個がデータベース化されており、糖尿病を含めて尿ペプチドマーカー探索のための研究環境が整ってきている。

おわりに

本稿では、プロテオーム/ペプチドームの分野での糖尿病バイオマーカー探索研究の現状について概説した。筆者の所属する国立国際医療研究センターでは、厚生労働省の指導の下で行われている「創薬バイオマーカー探索研究」の一環として、糖尿病性細小血管症早期診断のための診断マーカー開発を目的とした研究が進行中である(図2)。本計画では、糖尿病患者から血清および尿を採取する際に、糖尿病性細小血管症および動脈硬化の進行度を含む詳細な

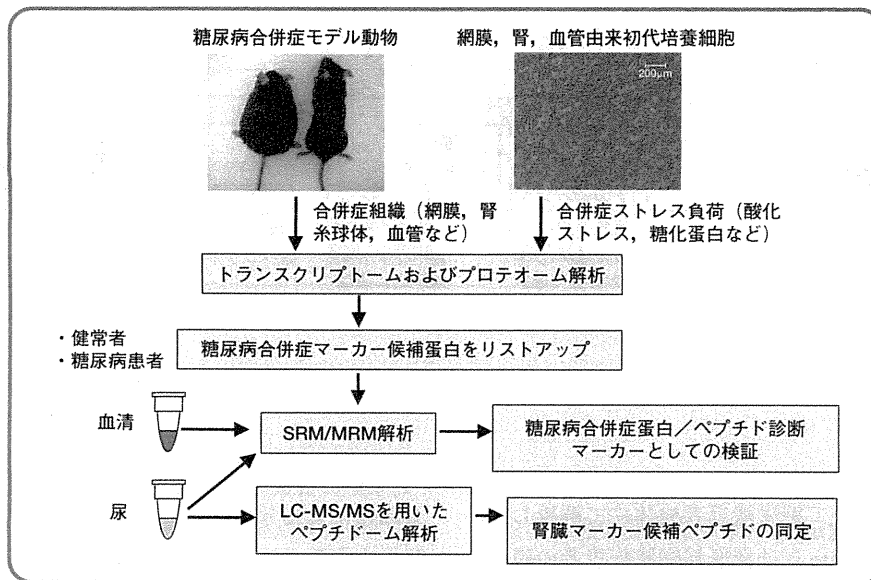


図2. 創薬バイオマーカー探索研究での糖尿病合併症・早期診断マーカーの探索のワークフロー

臨床情報を収集しており、動物実験や細胞での実験によって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SRM/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ワークフローで解析を進めている。また、尿蛋白/ペプチドについても液体クロマトグラフィと質量分析器を組み合わせたシステムを用いて解析中である。これらの解析から、糖尿病性細小血管症のサロゲートエンドポイントとなるバイオマーカーが開発されることに期待したい。

●文献

1. Temple R : Are surrogate markers adequate to assess cardiovascular disease drugs? JAMA **282** : 790-795, 1999
2. Katz R : Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. NeuroRx **1** : 185-195, 2004
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Eng J Med **329** : 977-986, 1993
4. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group : Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet **352** : 837-853, 1998
5. Perrin NE, Torbjörnsdotter TB, Jaremko GA, et al : The course of diabetic glomerulopathy in patients with type 1 diabetes: a 6-year follow-up with serial biopsies. Kidney Int **69** : 699-705, 2006
6. Araki S, Haneda M, Koya D, et al : Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes. Diabetes **56** : 1727-1730, 2007
7. Yoshida Y, Miyamoto M, Taguchi I, et al : Human kidney glomerulus proteome and biomarker discovery of kidney diseases. Proteomics Clin Appl **2** : 420-427, 2008
8. Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, et al : In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Proteome Res **6** : 3680-3690, 2007
9. Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al : Proteome analysis of human vitreous proteins. Mol Cell Proteomics **2** : 1177-1187, 2003
10. Kim T, Kim SJ, Kim K, et al : Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. Proteomics **7** : 4203-4215, 2007
11. Gao BB, Chen X, Timothy N, et al : Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. J Proteome Res **7** : 2516-2525, 2008
12. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al : Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney Int **63** : 225-232, 2003
13. Cho EH, Kim MR, Kim HJ, et al : The discovery of biomarkers for type 2 diabetic nephropathy by serum proteome analysis. Proteomics Clin Appl **1** : 352-361, 2007
14. Yang YH, Zhang S, Cui JF, et al : Diagnostic potential of serum protein pattern in Type 2 diabetic nephropathy. Diabet Med **24** : 1386-1392, 2007
15. Overgaard AJ, Hansen HG, Lajer M, et al : Plasma proteome analysis of patients with type 1 diabetes with diabetic nephropathy. Proteome

- Sci 8 : 4, 2010
16. Anderson L, Hunter CL : Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 5 : 573-588, 2006
 17. Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, et al : Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of protein in plasma. *Nat Biotechnol* 27 : 633-641, 2009
 18. Kim K, Kim SJ, Yu HG, et al : Verification of biomarkers for diabetic retinopathy by multiple reaction monitoring. *J Proteome Res* 9 : 689-699, 2010
 19. Morrow DA, Braunwald E : Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* 108 : 250-252, 2003
 20. Rossing K, Mischak H, Rossing P, et al : The urinary proteome in diabetes and diabetes-associated complications: New ways to assess disease progression and evaluate therapy. *Proteomics Clin Appl* 2 : 997-1007, 2008
 21. Rao PV, Lu X, Standley M, et al : Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 30 : 629-637, 2007
 22. Kentsis A, Monigatti F, Dorff K, et al : Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* 3 : 1052-1061, 2009
 23. Merchant ML, Perkins BA, Boratyn GM, et al : Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 20 : 2065-2074, 2009
 24. Good DM, Zurbig P, Argiles A, et al : Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics* 9 : 2424-2437, 2010

最新医学・第67巻・第1号（2012年1月号 別刷）

特集 糖尿病とその合併症の成因－最新の知見－

メタボロームと糖尿病

山下 亮 曾我朋義 鏑木康志

最新医学社

● 総論

メタボロームと糖尿病

山下 亮*¹ 曾我朋義**¹ 鏑木康志*²

要 旨

近年の分析技術の発達により、従来の1分子の測定から、数百から数千というオーダーの代謝物の一斉解析が可能となり、メタボロミクスという分野が急速に発展してきた。生体内の代謝産物の恒常性が破綻した状態とも言える糖尿病のような代謝性疾患において、代謝物の総体を把握できるメタボローム解析は強力な研究ツールとなると考えられる。本稿では、メタボローム解析手法と最新の糖尿病領域におけるメタボローム研究例を紹介する。

メタボロミクスについて

生体内には多種多様の代謝経路が存在し、代謝反応の結果として生じる代謝産物量も、環境や疾患をはじめとするさまざまな要因によって変化する。これらの代謝産物の総体をメタボロームと呼び、メタボロミクスとは細胞内において刻々と変化するこれらの代謝物を網羅的に測定・解析しようとするものである。従来から古典的な分析方法により生体内代謝物の解析は行われていたが、1990年代にメタボローム、メタボロミクスの概念が提唱され始め、2000年代に入ると機器分析の発達とともに本格的に網羅的な代謝解析研究が普及し、ここ数年国内外におけるメタボロミクスに関連する論文数は飛躍的に伸び続け

ている。ヒトにおける総遺伝子が約 25,000、タンパク質が約 100,000 という膨大な数に対して、現在 Human Metabolome Database (HMDB) に登録されている代謝物は 7,900 であり、他のオミックスに比べて比較的総体を把握しやすいと考えられる¹⁾²⁾。

メタボローム解析法

代謝物の測定法としては、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS)、核磁気共鳴装置 (NMR) など、さまざまな分析技術が応用されている。各手法にはそれぞれの特徴がある。例えば GC-MS は高分解能であり、中性物質から極性の高い代謝物まで幅広く測定が可能である。しかしながら揮発性にするための誘導体化が必要であり、この過程で定量性が低下するなどの問題がある。また、GC-MS

*¹ 慶應義塾大学先端生命科学研究所 **¹ 同 教授

*² 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 部長

キーワード：メタボロミクス、メタボローム、
バイオマーカー

はリン脂質など不揮発性の測定にも適していない。一方で、LC-MS や CE-MS は化学的誘導体化の必要がない半面、それぞれが得意とする代謝物の物性に偏りがある。現段階ではすべての代謝物に適応できる単一の手法はなく、目的代謝物質の性質によってこれらの測定法を使い分ける必要がある。

糖尿病領域におけるメタボローム解析

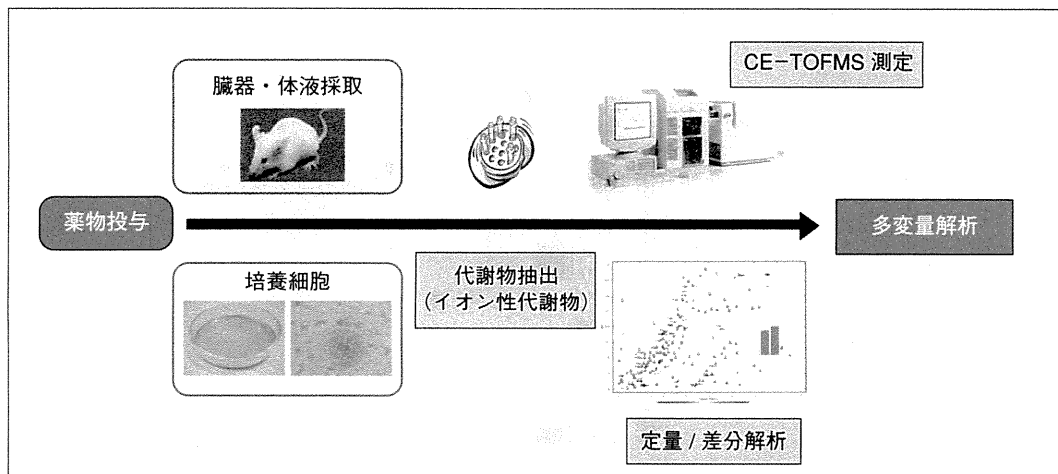
メタボローム解析はプロテオーム解析と同様に、さまざまな疾病に関してメカニズムの解明や発症予測あるいは診断を目的としたバイオマーカーの探索などに利用されてきている。他のオミックス解析に比べて比較的新しい技術ではあるが、糖尿病領域においてもここ数年メタボローム解析の報告が増えてきており、ここではその最新の知見を紹介する。

Wang らは、コホート研究 (Framingham Offspring Study) で、12 年間で糖尿病を発症した患者 201 人の中から年齢、BMI、空腹時血糖値を合わせた 189 人を選び、血液を試料として、アミノ酸、アミン類を対象とした LC-MS メタボローム解析を行った³⁾。その結果、5 種の分岐鎖アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、バリン) と芳香族アミノ酸 (チロシン、フェニルアラニン) の血中濃度は、将来の糖尿病発症と有意な相関が見られた。その中でも、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニンの 3 種のアミノ酸の組み合わせを用いることで、より正確に糖尿病の発症予測ができることが分かった。分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の糖尿病における役割については詳細が分かっておらず、今後の研究が待たれる。Suhre らは最近、全ゲノム関連解析 (GWAS) とノンターゲットメタボロミクスを組み合わせた網羅的 genotype-dependent metabolic phenotype 解析の結果を報告した⁴⁾。GWAS は疾患とゲノムの特定領域との関連を明らかにできるものの、その遺伝子の

持つ生物学的機能などが分からず、情報量に欠けている。彼らは、2つの大規模集団ベースコホート研究の中で 2,820 人の血清中のメタボローム解析を行い、個々の代謝特性と GWAS との相関性を調べることで生物学的意義づけを含む解析を実現した。メタボローム解析には、前立腺がんの代謝物マーカーを同定した実績を持つ Metabolon 社の LC-MS と GC-MS のプラットフォームを利用し、295 種の低分子代謝物の測定を行い、その中から血中代謝物濃度と相関のある 37 の遺伝子座を同定した。これらの遺伝子は、心疾患や腎疾患、糖尿病、がんなど多くの疾患との関連があるものであり、代謝物との関連性も含め新たな情報や知見を与えている。特定した遺伝子の中で糖尿病に関係する遺伝子として、空腹時血糖値、インスリン値、トリグリセリド、慢性腎疾患に関連するリスク遺伝子座 GCKR (glucokinase regulator) を同定した。この遺伝子座が低分子代謝物、マンノース/グルコース比と高い相関性があることを見いだした。このリスクアレルのキャリアーは高血糖であり、かつ空腹時マンノース値が低い。マンノースの糖尿病における生理的役割については幾つかの裏づけになるような基礎的実験の報告もあることから、バイオマーカーとして今後診療において実用化するため、さらなる研究が必要であるとしている。このようにゲノムベースでヒト個々の代謝特性を解明することで、個別化療法の進展に繋がるとしている。

糖尿病合併症のメカニズム解析への期待も大きい。Zhao らは、ストレプトゾトシン誘導糖尿病発症ラットの尿、腎組織の NMR によるメタボローム解析を行った⁵⁾。代謝物の定量情報から主成分分析を行い、得られた代謝物プロファイルは糖尿病群とコントロール群で区分されたとしている。8 週目の糖尿病ラットの尿からは、アスコルビン酸、コハ

図1 CE-MS を用いたメタボローム解析の流れ



ク酸、乳酸、クエン酸、アラントイン、2-ケトグルタル酸、3-ヒドロキシブチレート (3-HB) が有意に高値を示し、一方でクレアチニン、ジメチルアラニンが低下した。腎組織においては 3-HB が上昇し、コハク酸、クレアチニン、ミオイノシトール、アラニン、乳酸、ATP が低下した。この現象を統合的に解釈し、腎症ラットは脂質やケトン体合成が亢進し、一方で TCA 回路や解糖系が低下することを見いだした。筆者らは結論として、メタボローム解析を通じ、エネルギー代謝と腎症の病態との関連性を示している。

メタボロームは、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームのネット変動の結果を反映し、生物学的な統合プロファイルを表していると考えられている。糖尿病は遺伝素因だけでなく環境因子も影響する複合的な要因を持ち、かつ、膵、肝、筋肉、脂肪など複数の臓器が疾患の進展に関与している。メタボローム解析はその複雑性を理解、解釈するための重要なツールになると考えられる²⁾。

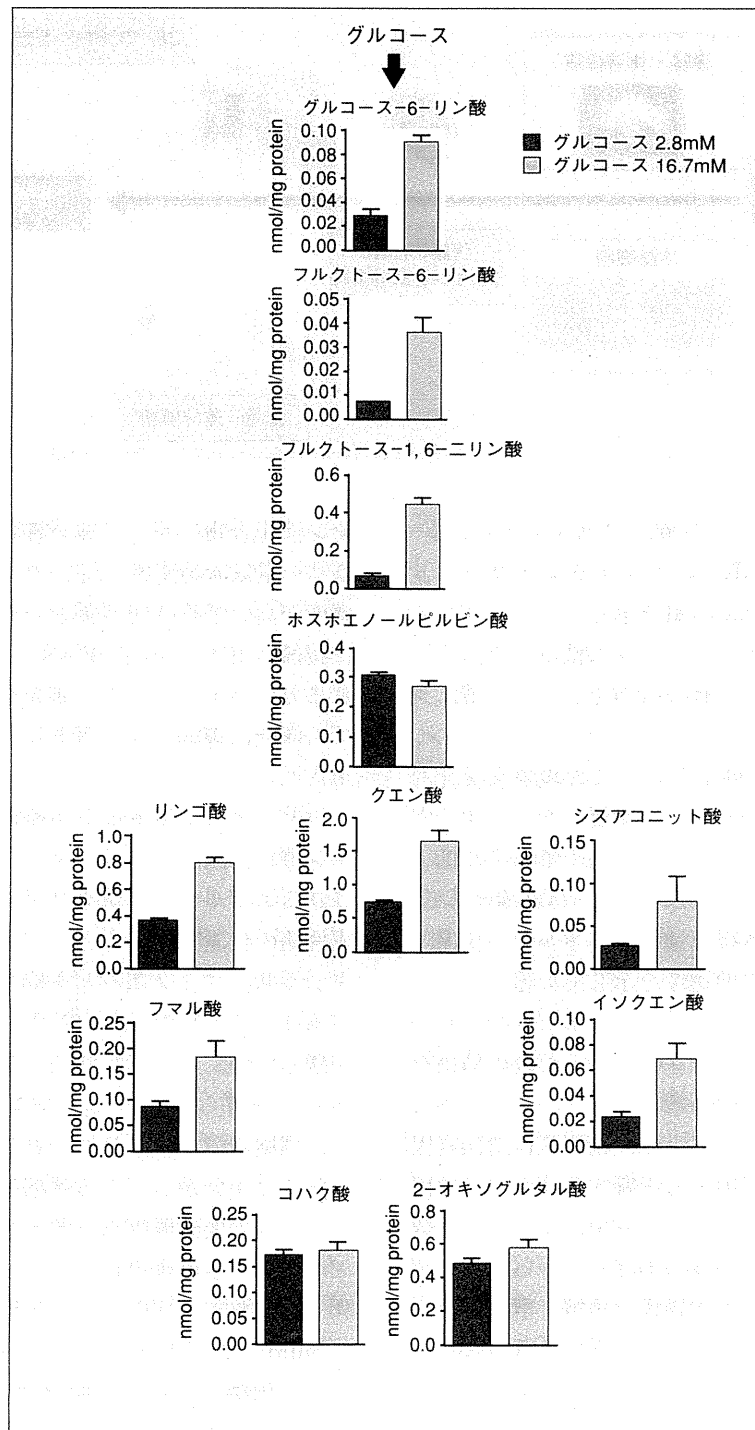
CE-MS による膵β細胞株の メタボローム解析例

慶應義塾大学先端生命科学研究所では、イ

オン性化合物に対して高分離能を示すキャピラリー電気泳動装置 (CE) をスルーットと感度が高い飛行時間型質量分析計 (TOFMS) に接続させた CE-TOFMS 法を開発し、これまでにバイオマーカー研究やがんのメカニズム研究に適応させ、報告してきている (図 1)⁶⁻⁸⁾。

ほとんどの生物が有する解糖系、TCA (クエン酸) 回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路の代謝物の多くは、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基などを持つイオン性物質であり、NMR や LC-MS などでは一斉分析が難しいが、CE-MS ではこの測定が可能である。筆者らはこの CE-MS の特性を活かし、細胞内でインスリン分泌と密接な関係があることが分かっている解糖系や TCA 中間代謝物群の変動解析を目的とし、膵β細胞のメタボローム解析を行った。ハムスター由来膵β細胞株 (HIT-T15) を低グルコース下 (2.8mM) と高グルコース下 (16.7mM) それぞれで刺激した後、細胞を回収し、水/メタノール/クロロホルムの液-液分配法により脂質やタンパク質を除き、細胞内低分子代謝物を回収した。当研究所では 500 以上もの

図2 CE-MSによる膵β細胞株 HIT-T15 での解糖系および TCA 回路の中間代謝物の定量結果



化合物ライブラリーを有し、生体内代謝物の網羅的定量解析法を構築している。本試験では解糖系から派生した一部の代謝経路にフォーカスしたターゲットイッドな解析を行うべく、112種の化合物ライブラリーをスタンダードとして使用した。ポジティブモードとネガティブモードそれぞれでMS測定を行い、陽イオン性代謝物と陰イオン性代謝物合わせて84代謝物を定量することができた。図2に解糖系とTCA回路にマップされた一部の代謝物の定量結果を示した。グルコースの流入によって起こる細胞内のダイナミックな代謝物変動が見てとれる。CE-MS代謝物解析により、さらなるインスリン分泌のメカニズム解明や薬剤などの作用検証にも応用展開できるものと考えている。

これからのメタボロミクスの課題と発展

新たなオミックス研究としてメタボロミクスが注目を浴び始め、今後も幅広い分野への貢献が期待されるが、まだまだ発展途上の段階にあり課題も多い。今後は、機種に依存しないマルチな測定法の開発が期待される。また現在のメタボローム解析の問題点として、プロテオーム解析のように得られたMSスペクトルを用い、データベースによる物質同定が容易にできないことが挙げられる。さらに、メタボローム解析では標品を用いた物質同定が一般的であり、入手できる化合物が限られていることから、同定できない未知物質も数

多くある。多くの代謝経路に属する化合物標品セットの入手や、質量分析装置の機種に依存せず共通して利用可能な代謝物同定データベースの確立などが、解決策として待たれる。

文 献

- 1) Human Metabolome Database web site: <http://www.hmdb.ca/>
- 2) Bain J.R, et al: Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes* 58 (11): 2429–2443. 2009.
- 3) Wang T.J, et al: Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17 (4): 448–453. 2011.
- 4) Suhre K, et al: Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 477 (7362): 54–60. 2011.
- 5) Zhao L, et al: ¹H-NMR-based metabolomic analysis of metabolic profiling in diabetic nephropathy rats induced by streptozotocin. *Am J Physiol Renal Physiol* 300 (4): F947–F956. 2011.
- 6) Soga T, et al: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2 (5): 488–494. 2003.
- 7) Soga T, et al: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 281 (24): 16768–16776. 2006.
- 8) Hirayama A, et al: Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69 (11): 4918–4925. 2009.

Metabolomic Analysis for Diabetes Research

Ryo Yamashita¹, Tomoyoshi Soga¹, Yasushi Kaburagi²

¹ Institute for Advanced Biosciences, Keio University

² Department of Diabetic Complications, Diabetes Research Center, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

日本臨牀 第70巻・第5号（平成24年5月号）別刷

特集：最新の疾患バイオマーカー研究

糖尿病・肥満

鈴木康志 久保田浩之

II. 疾患バイオマーカーの基礎研究 生活習慣病バイオマーカーの基礎研究

糖尿病・肥満

鎌木 康志 久保田 浩之

Perspective of proteomic studies for discovering biomarkers of diabetes and obesity

Yasushi Kaburagi, Hiroyuki Unoki-Kubota

Department of Diabetic Complications, Diabetes Research Center,

Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

Abstract

The prevalence of diabetes is rapidly increasing worldwide, leading to an increasing risk of microangiopathic complications. To identify biomarkers of diabetic microangiopathy that are useful for prevention and early treatment of diabetic complications, proteomic analyses of clinical samples from diabetic patients have been performed. However, as diabetes is a systemic disease, it is difficult to define the pathologic conditions and foci causing changes in proteomic profile of clinical samples from diabetics. An approach using multiple reaction monitoring may be useful to systemically identify diabetic microangiopathy biomarkers from blood and urine samples from diabetic patients.

Key words: diabetes, microangiopathy, biomarker, proteome, SRM/MRM

はじめに

糖尿病は国内外で急増しており、国際糖尿病連合の2010年の発表によると世界の糖尿病有病者は2億8,500万人と全人口の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4億3,800万人と推計されており、全世界で脅威になっている。日本でも糖尿病を含む生活習慣病は急増しており、厚生労働省の2007年国民健康・栄養調査では糖尿病有病者および糖尿病予備軍(JDS値でHbA1c 5.6%以上)は総計2,210万人と5年前と比較して30%以上増加している。生活習慣病では心筋梗塞、脳梗塞といった大血管症が増加するが、更に糖尿病では腎症、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する。糖尿病性細小血管症は腎症からの透析導入の44.5%(原因疾患の第1位)、網膜症からの失明(失明原因の2位)、糖尿病性壊疽による下肢切断といった重篤な合併症を引き起こし、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を予防あるいは早期治療するためには、その病期や予後を簡便に診断可能なバイオマーカーが開発されればその意義は高い。本稿では、プロテオーム解析による糖尿病性細小血管症マーカー探索研究について概説する。

1. 糖尿病性細小血管症と サロゲートマーカー

糖尿病の診療においては、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既に広く用いられている。血糖、HbA1c 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合併症の発症およ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^{1,2)}。ところが、個々の患者において合併症の有無あるいは予後を予測可能なバイオマーカーは存在しない。例えば、腎症では微量アルブミン尿が病期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型および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進行を予測するサロゲートマーカーとはなりえない³⁾。

2. 糖尿病患者の組織サンプルでのプロテオーム解析

糖尿病性細小血管症の診断マーカータンパクを探索するためには、プロテオームの手法による患者由来組織の解析が有意義であり、細小血管症の起こる腎臓、網膜、神経、血管などが解析の対象となる。実際、腎症についてはYoshidaらが、手術時に摘出した腎臓から糸球体を単離し、SDS-PAGE後に高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)にて解析し、2,966遺伝子に由来する6,686個のタンパクを同定している⁴⁾。また、この研究グループは腎生検サンプルからlaser microdissectionにより糸球体を採取し、二次元電気泳動により糸球体由来タンパクを定量解析する実験系を確立⁵⁾しており、これらの研究が腎症の診断および治療に有用なタンパクの発見につながる可能性がある。

また、網膜症については、増殖性網膜症への硝子体手術時に採取される硝子体を用いたプロテオーム解析が行われている^{6,7)}。最近の分析結果では、LC-MS解析によって500個程度のタンパクが増殖性網膜症患者の硝子体から同定されており⁷⁾、網膜症の新しい診断、治療につながる事が期待される。

3. 血液サンプルを用いたプロテオーム解析の問題点およびその対策

血液は糖尿病診療の現場で日常的に採取されるため、血清・血漿はバイオマーカー探索のための第一の研究対象となる。ところが、糖尿病は全身疾患であるため、同定された血液マーカー候補タンパクの変動がどの臓器の病態に由来するかは特定するのは困難である。

近年、あらかじめ判明しているバイオマーカー候補タンパクについて質量分析器を用いて高感度で特異的に定量できるselected reaction monitoring (SRM)/multiple reaction monitoring (MRM)法による解析が使われるようになってきた^{8,9)}。このSRM/MRM法では、タンパク試料の酵素消化後のペプチドを液体クロマトグラフィーにオンラインで接続した三連四重極型質量分析器で分析する(図1)。イオン化させたペプチドから、Q1にて特定の質量をもつ親イオンのみを通過させ、選択された親イオンをQ2で限定的に破壊して断片化させて娘イオンを作り、Q3で断片化された特定の質量の娘イオンを定量することによって、非常に高いS選択性での分析が可能である。本法を用いて糖尿病患者試料にて解析した研究はまだわずかだが、Kimらは糖尿病性網膜症患者の硝子体サンプルにて有意に変動した12個のタンパクについて、患者血漿にてSRM/MRM法を用いて定量している¹⁰⁾。このアプローチでは、他の実験系にて糖尿病合併症との関連性が検証済みのタンパクを患者試料で定量評価することが可能であるため、糖尿病性細小血管症マーカー探索への応用が期待される。

SRM/MRM法のもう一つの利点として、一度に多数のトランジションを組み合わせることができるので、血清・血漿のような複雑なサンプルであっても、一度に多数のタンパクの定量解析を行うことが可能である。近年、種々の疾患において単一のバイオマーカーによる病態把握には限界があるため、いくつものバイオマーカーを組み合わせたマルチマーカーの使用が提唱されている¹¹⁾が、SRM/MRM法はこの点でも大きく力

三連四重極型質量分析器

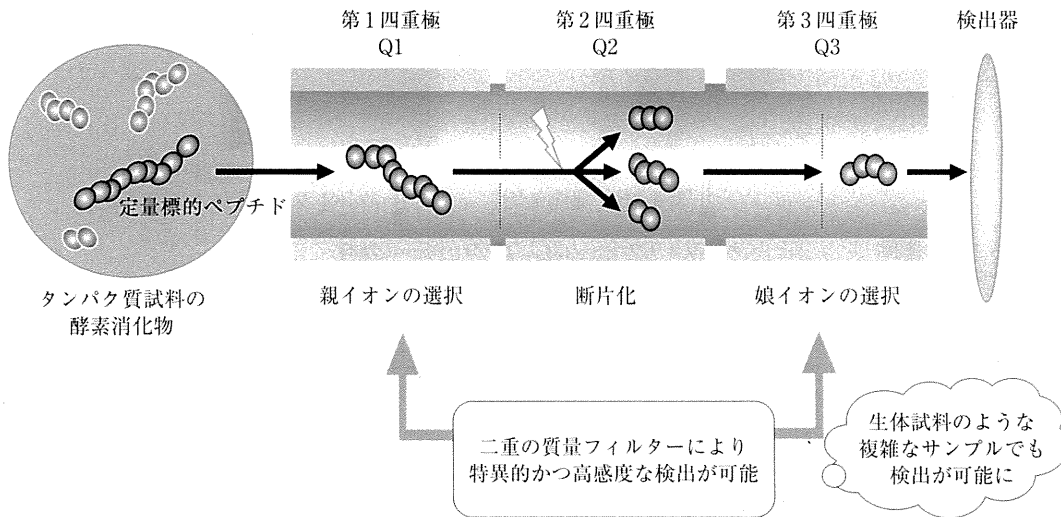


図1 SRM/MRM 測定原理

を發揮する可能性がある。

4. 糖尿病患者尿のプロテオーム/ペプチドーム解析

尿タンパクの約70%が腎臓あるいは尿路に由来するとされている。このため、腎障害は尿中のタンパクあるいはペプチドのプロファイルに影響を与えると考えられ、尿プロテオームあるいはペプチドーム解析は腎症マーカー探索の有効な手段となる。数年前までは、二次元電気泳動に質量分析を組み合わせた解析法が主要な手段であったが、二次元ゲル上で解析可能なタンパクスポットは数百にすぎず、また解析に多大な労力および時間がかかる短所があった¹²⁾。近年、よりハイスループットな手法として、尿タンパクの酵素消化にて得られたペプチドをLC-MS解析することによって、2,000個以上のタンパクの同定が可能となっている¹³⁾。また、10kDa以下のペプチドはキャピラリー電気泳動装置に質量分析計を組み合わせたシステム(CE-MS)にて解析可能であり、Merchantらは、1型糖尿病患者にて早期の腎機能障害で低下す

る3個の尿ペプチドを見いだしている¹⁴⁾。最近、CE-MSやLC-MSにて同定される尿ペプチド約5,000個がデータベース化¹⁵⁾されており、糖尿病を含めて尿ペプチドマーカー探索のための研究環境が整ってきている。

おわりに

本稿では、プロテオーム/ペプチドームの分野での糖尿病バイオマーカー探索研究の現状について概説した。著者らの所属する国立国際医療研究センターでは、糖尿病性細小血管症早期診断のための診断マーカー開発を目的とした研究が進行中である(図2)。本計画では、動物実験や培養細胞での実験によって糖尿病に関連した変化が起こることが判明しているタンパクについて、糖尿病性細小血管症の進行度が判明している患者検体をSRM/MRM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検証するワークフローで解析を進めている。本研究により糖尿病性細小血管症のサロゲートマーカーが開発されることに期待したい。

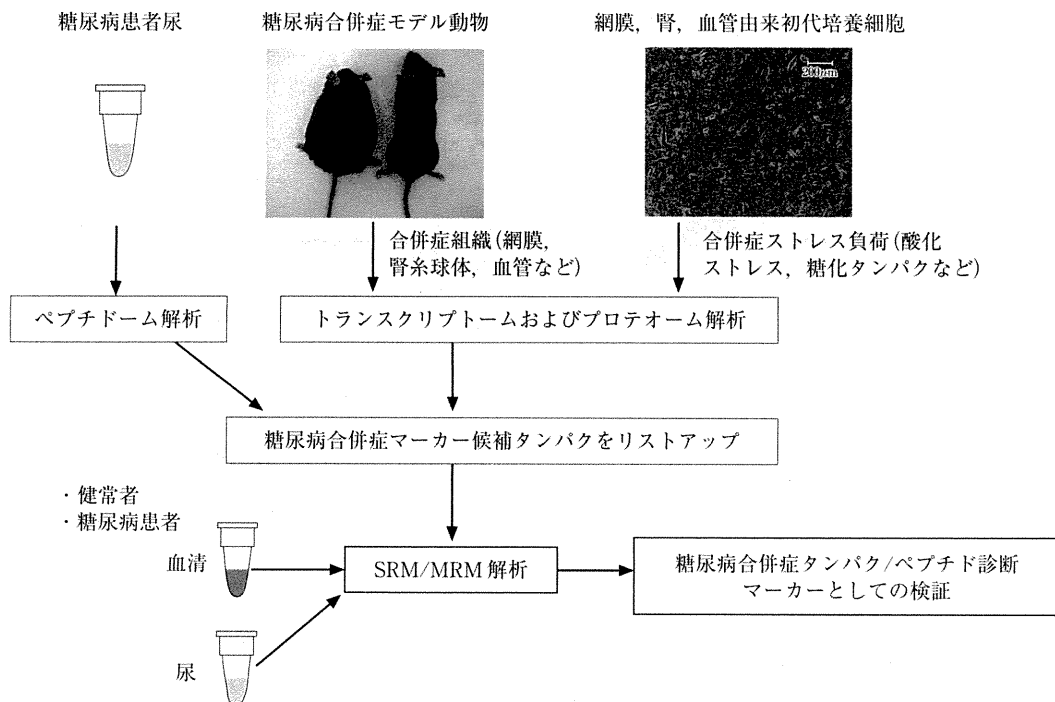


図2 SRM/MRM 測定を用いた糖尿病性微小血管症・診断マーカー探索のワークフロー

■ 文 献

- 1) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**: 977-986, 1993.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**: 837-853, 1998.
- 3) Araki S, et al: Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **56**: 1727-1730, 2007.
- 4) Yoshida Y, et al: Human kidney glomerulus proteome and biomarker discovery of kidney diseases. *Proteomics Clin Appl* **2**: 420-427, 2008.
- 5) Miyamoto M, et al: In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein pre-fractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **6**: 3680-3690, 2007.
- 6) Kim T, et al: Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics* **7**: 4203-4215, 2007.
- 7) Gao BB, et al: Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* **7**: 2516-2525, 2008.
- 8) Anderson L, Hunter CL: Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**: 573-588, 2006.
- 9) Addona TA, et al: Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of protein in plasma. *Nat Biotechnol* **27**: 633-641, 2009.
- 10) Kim K, et al: Verification of biomarkers for diabetic retinopathy by multiple reaction monitoring. *J*

Proteome Res **9**: 689-699, 2010.

- 11) Morrow DA, Braunwald E: Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* **108**: 250-252, 2003.
- 12) Rossing K, et al: The urinary proteome in diabetes and diabetes-associated complications: New ways to assess disease progression and evaluate therapy. *Proteomics Clin Appl* **2**: 997-1007, 2008.
- 13) Kentsis A, et al: Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* **3**: 1052-1061, 2009.
- 14) Merchant ML, et al: Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* **20**: 2065-2074, 2009.
- 15) Good DM, et al: Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics* **9**: 2424-2437, 2010.

