

2012 07001B

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20年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 春日 雅人

平成25 (2013) 年 5月

目 次

I. 総合研究報告

- 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. 定量的プロテオミクスを用いた 2 型糖尿病関連血清因子の探索 5
高橋 枝里、久保田 浩之
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 17
奥村 彰規、鏑木 康志
3. 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 34
鏑木 康志
4. cICAT 法での糖尿病患者血清解析データの多変量解析による検
討 40
野田 光彦
5. 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 46
鏑木 康志
6. サイトカイン L E C T 2 と糖尿病関連疾患との関連解析 58
奥村 彰規、鏑木 康志
7. 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動による糖尿病腎症患者尿のプ
ロテオーム解析 69
鏑木 康志

8. 非標識定量プロテオーム解析による糖尿病腎症の新規バイオマーカー探索	78
高倉 美智子、鏑木 康志	
9. 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	88
佐藤 恵美、鏑木 康志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷	102

I. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総合研究報告書

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

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

総長

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の早期診断マーカーを探索する目的で本施設を含めた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、尿検体の収集、ならびに検体に付随する糖尿病性細小血管症を含めた臨床情報の収集を開始し、研究期間内に2型糖尿病患者検体 約1000例、健常者検体 約600例とほぼ目標を達成することが出来た。糖尿病性細小血管症の早期診断マーカーの探索にあたっては疾患モデル動物や臨床検体から得られた血清、ならびに尿を探索対象とし、蛍光標識二次元ディフレンスゲル電気泳動法や標識/非標識定量法を用いた定量的プロテオミクス解析により探索を行った。また、網羅的な探索の結果得られた多数の候補タンパク質の中から糖尿病性細小血管症の関連マーカーを選出するために、targeted proteomicsの一手法であるmultiple reaction monitoring (MRM)法による定量解析法を確立し、多項目一斉定量分析を行うことが可能となった。Non-targeted、およびtargeted proteomicsを組み合わせた血清を対象とする解析の成果としては、血管内皮細胞の透過性

を調節し糖尿病性網膜症の発症への関与が推測されるタンパク質をはじめとする2型糖尿病関連タンパク質の同定が挙げられる。また、尿検体を用いた解析でも糖尿病腎症の早期から関連するタンパク質を効率よく同定することに成功し、この中にはこれまでに糖尿病との関連が報告されていない新たな早期診断マーカー候補も含まれていた。本研究により糖尿病性細小血管症の早期診断に有用なマーカー候補を絞り込むことが可能となり、これらの成果を発展させて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ることが期待される。

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。糖尿病では、糖尿病に固有な微細血管の機能及び形態異常が生じ、これは糖尿病性細小血管症と呼ばれる。糖尿病性細小血管症の中で、糖尿病性神経障害は末梢神経及び自律神経の障害として起こり、さらに進行した糖尿病

性壊疽による下肢切断は糖尿病患者の1/3以上にみられる。糖尿病性網膜症では、眼底の毛細血管の変化の結果として血管の閉塞、浮腫、出血などが進行し、硝子体への出血、網膜剥離から失明に至る。糖尿病性網膜症は失明原因の2位を占める。糖尿病腎症は、細小血管障害が腎糸球体に生じて、初期は微量のアルブミンが尿に出現する状態から進行すると腎機能が低下し、最終的に人工透析を要する腎不全に至る病態である。糖尿病腎症が原因の透析導入患者数はいまだに増え続けており、透析導入原因疾患の40%以上と第1位を占めている。これらの糖尿病性細小血管症は重篤な合併症が進行するまで自覚症状を伴わないため、日常診療の現場で糖尿病性細小血管症の病期や予後・進行性などを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た。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を行い、2型糖尿病患者検体 約1000例、健常者検体 約600例とほぼ目標を達成することが出来た。尿検体を用いた糖尿病腎症関連マーカーの探索では、non-targeted、およびtargetedプロテオーム解析を組み合わせることにより糖尿病腎症の早期から関連するタンパク質を効率よく同定することに成功し、この中にはこれまでに糖尿病との関連が報告されていない新たな早期診断マーカー候補も含まれていた。血清プロテオーム解析でも同様にnon-targeted/targeted proteomicsを併用し、血管内皮細胞の透過性を調節し糖尿病性網膜症の発症への関与が推測されるタンパク

質を中心として複数の糖尿病/糖尿病性細小血管症関連タンパク質の同定に成功した。

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た。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となった。本研究をさらに発展させ信頼性の高い糖尿病性細小血管症に関する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

F. 研究発表

1. 論文発表：

なし

2. 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

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. 定量的プロテオミクスを用いた2型糖尿病関連血清因子の探索

分担研究者 高橋枝里、久保田浩之

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

【目的】糖尿病(合併症)の予防と進展の抑制には治療面での介入に加え、糖尿病(合併症)の予測に有用なバイオマーカーの活用が有用となりうる。本研究では、2型糖尿病の発症初期より変動する2型糖尿病関連因子を探索することを目的として定量的血清プロテオーム解析を行った。【方法】2型糖尿病モデルであるKK-A^yマウス、ならびに非糖尿病対照マウスとしてC57BL/6マウスより空腹時血清を採取した(4週齢♂, n=3/群)。血清中の多量タンパク質をSeppro Mouse Spin Columns (Sigma-Aldrich)にて除去後トリプシン消化し、iTRAQ Reagents 4-plex (ABSciex)を用いて標識を行った。内部標準としてKK-A^yマウス、C57BL/6マウス各3検体を等量ずつ混合したサンプルを調製し、iTRAQ標識を行った。iTRAQ標識された3検体をKK-A^yマウス、C57BL/6マウス別に混合し、それぞれに内部標準サンプルを加えた後に強陽イオン交換カラムにて分画し、QSTAR Elite (ABSciex)にてNanoLC-MS/MS解析を行った。測定タンパク質の同定と相対定量解析はProteinPilotソフトウェアを用いて行った。Multiple reaction monitoring (MRM)法による定量解析には4週齢、12週齢マウスの空腹時血清を用い(♂, n=5/群)、5500 QTRAP (ABSciex)にてNanoLC-MRMを行った。【結果】KK-A^yマウス、ならびにC57BL/6マウス血清より227タンパク質が同定され、そのうち両マウス群間で発現変動を認めるタンパク質は45種認められた。MRM定量解析が可能であった34タンパク質を対象に4週齢、ならびに12週齢マウス血清濃度の経時変化を測定した結果、いず

れの週齢でも両群間で有意な発現変動を示すタンパク質が8種類抽出された。そのうちの一つのタンパク質である serine protease inhibitor A3 (SERPINA3) のヒト血清濃度は、健常人に比べて2型糖尿病患者、糖尿病性網膜症患者で上昇する傾向を認めた。培養ヒト網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 解析では、ヒト SERPINA3 タンパク質が細胞増殖能や細胞遊走能には影響を与えないものの、細胞透過性を亢進させる作用を有した。【考察】 iTRAQ 法を用いた定量的プロテオーム解析と MRM 定量解析法を組み合わせることにより、2型糖尿病の発症早期より発現変動するタンパク質を同定することに成功した。これらのタンパク質の発現変動は2型糖尿病や糖尿病合併症の発症・進展に関連する可能性がある。

A. 研究目的

世界的な糖尿病の蔓延は悪化の一途をたどっており、2012年の国際糖尿病連合報告によると推定糖尿病患者数は3億7,100万人に上ることが示された。我が国においても予備軍まで含めると今や成人の5人に1人が何らかの糖代謝異常を持つと推定されており、効率的な治療法や予防法の開発は急務な課題の一つである。糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病はインスリンの作用不足によって起こる慢性高血糖を主徴とし、耐糖能の低下が認められるよりもかなり前からインスリン抵抗性が出現する。血液中因子の中にはインスリン抵抗性の出現に関与するものも知られており、例えば、interleukin-6, adiponectin, plasminogen activator inhibitor-I は骨格筋などに作用し、インスリンシグナル伝達障害を引き起

こしてインスリン抵抗性の出現に直接関与する。2型糖尿病の発症・進展には遺伝素因や肥満、加齢、生活習慣など種々の要因が関与しており、その病態は多様であることから、多数の血液中因子を同時に同定することができるプロテオーム解析技術は新たな2型糖尿病の病態解明につながる可能性がある。そこで本研究では、自然発症肥満性糖尿病モデル KK-A^y マウスと対照 C57BL/6 マウス血清を用い、iTRAQ 法と質量分析装置を組み合わせることにより糖尿病発症初期における血清タンパク質の網羅的解析ならびに相対定量を行った。

B. 研究方法

2-1. 糖尿病モデルマウス

自然発症肥満性2型糖尿病モデル KK-A^y マウス、ならびに対照マウスとして C57BL/6

Jマウス(日本クレア(株))血清を解析対象とした。4, 8, 12, 16週齢のマウス血清はマウスを16時間絶食後に眼窩静脈叢より採血して調製した。経口糖負荷試験は4週齢マウスを対象に行った。16時間絶食後のマウスにグルコース溶液(2 mg/g body weight)を経口投与し、15, 30, 45, 60分後の血糖値をアキュチェックアビバ(ロシュ・ダイアグノスティックス)により測定した。

2-2. マウス血清プロテオーム解析

4週齢KK-A^yマウス、C57BL/6マウス各3匹の血清からSeppro Mouse Spin Columns (Sigma-Aldrich) を用いて7種の血清中多量タンパク質の除去を行った。限外濾過により精製、脱塩を行った後、各検体より分取した25 μ gを解析に用いた。内部標準サンプルにはKK-A^yマウス、C57BL/6マウス各3検体より等量ずつ混合したサンプル25 μ gを用いた。タンパク質の変性、システイン残基の還元アルキル化後トリプシン消化を行い、iTRAQタグ(AB Sciex)で標識した。標識後のサンプルを混合した後、強陽イオン交換カラムを用いて分画し、画分ごとにnanoLC-MS/MS(AB-Sciex, QSTAR Elite)により測定した。測定結果に基づきMASCOTデータベースおよびProteinPilotソフトウェアを用いてタンパク質の同定およびiTRAQ比による相対定量を行った。ProteinPilot confidence > 95%で同定されたタンパク質を解析対象とし、KK-A^yマウス

—C57BL/6マウス間の定量値が有意差を示すタンパク質($p < 0.05$)、ならびにKK-A^yマウス、あるいはC57BL/6マウスのいずれか一方のみで同定・定量されたタンパク質を発現に差異が認められたタンパク質として抽出した。発現差異タンパク質についてGene Ontologyに基づく分類、およびIngenuity Pathways Analysis (IPA)ソフトウェアを用いたhypothetical network解析を行った。

2-3. Multiple Reaction Monitoring (MRM) 解析

2-3-1. MRM transitionの作成

iTRAQ解析で発現に差異が認められたタンパク質を対象にMRM定量解析を試みた。MRM transitionの設定は、iTRAQ解析で得られたMSデータに基づきMRM Pilotソフトウェアで行った。

2-3-2. MRM測定

iTRAQ解析とは独立した4, 12週齢KK-A^yマウスおよびC57BL/6マウスから調製した血清(n=5/each group)より多量タンパク質を除去後、限外濾過により脱塩・濃縮したものをサンプルとした。血清サンプルの酵素消化産物に内部標準物質としてヒトCUBドメイン含有タンパク質1のペプチド(EGVFTVTPDTK, 10 fmol)を添加した。MRM測定により得られた各ペプチドのシグナル面積値を内部標準物質より得られたペプチドのシグナル面積値で補正し、マウス

血清中の相対タンパク質濃度を算出した。

2-4. 細胞透過性の測定

2-4-1. ヒト網膜血管内皮細胞の培養

ヒト網膜培養血管内皮細胞(HRMVECs)はCell Systems(Kirkland, WA, USA)より購入した。HRMVECsをI型コラーゲンコートプレート(Iwaki, Tokyo, Japan)に播種し、EGM-2MV培地(Lonza, Basal, Switzerland)にて、37°C、5% CO₂濃度の条件で培養した。継代数が7~9代の時点で実験に供した。

2-4-2. ヒトSerine protease inhibitor A3(SERPINA3)タンパク質の調製

ヒトSERPINA3遺伝子を大腸菌BL21(DE3)に導入し、Hisタグ融合タンパク質として発現させた。組み換えタンパク質はニッケルアフィニティーカラム、ならびにポリミキシンBアフィニティーカラムにて精製した。精製SERPINA3タンパク質は限外ろ過フ

ィルターで濃縮し、タンパク質濃度を測定後、実験に使用するまで-80°Cで凍結保存した。

2-4-3. リアルタイム細胞解析

細胞透過性の測定はECIS Zθ (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) を用いて行った。HRMVECを血清飢餓培地(0.5%FBS添加EBM-2培地)にて8時間培養後、SERPINA3タンパク質(0~500 μg/mL)を添加し、細胞透過性の変化を測定した。ECISモデル化はGiaeverらの方法(2)によって行い、細胞間結合(Rb)、細胞-細胞外マトリックス間結合(α)、細胞膜キャパシタンス(Cm)の値をそれぞれ算出した。創傷治癒アッセイのための創傷刺激は、血清飢餓培地にて培養したHRMVECにSERPINA3タンパク質(0~500 μg/mL)を添加した6時間後に周波数60 kHz, 1400 μAの電流を20秒間加えることに

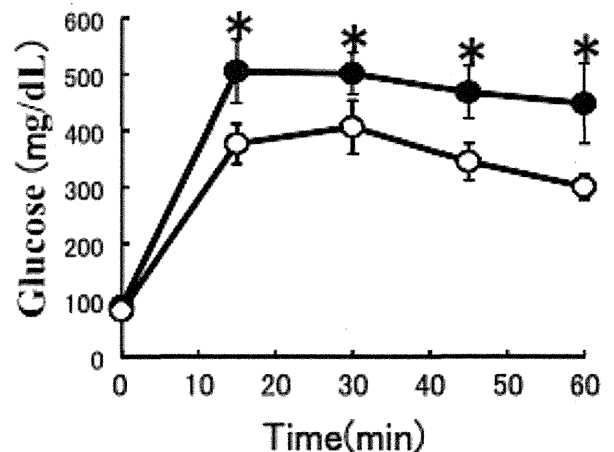
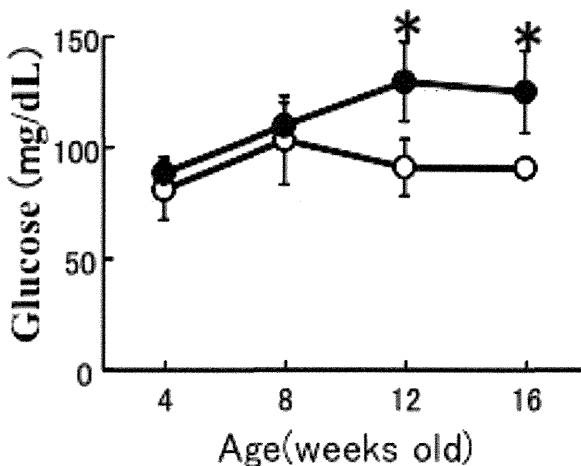


図1. KK-A^y (●)およびC57BL/6 (○)マウスの血糖値の変化。(左)空腹時血糖の週齢による変化。(右)4週齢時の経口糖負荷試験結果。

*: $p < 0.05$

より行った。細胞播種時から創傷処理後12時間まで16 kHzでインピーダンス値を連続的に測定した。

C. 研究結果

3-1. 糖尿病モデルマウス血清のプロテオーム解析

4~16週齢KK-A^yマウス、C57BL/6マウスの空腹時血糖の経時変化を測定した。KK-A^yマウスの空腹時血糖レベルは12, 16週齢でC57BL/6マウスより有意に上昇した(図1)。空腹時血糖レベルでは有意差を認めない4週齢マウスを用いて経口糖負荷試験を行ったところ、KK-A^yマウスでは糖負荷後の有意な血糖値上昇が認められた(図1)。糖尿病発症初期のマウス血清タンパク質プロファイルの差異を解析するため、4週齢マウスより血清を調製しiTRAQ解析を行った。血清中の同定タンパク質227種類のうち発現変動が認められたタンパク質は45種類であり、KK-A^yマウスで増加していたタンパク質は25種類(表1~2)、減少していたタンパク質は20種類(表3~4)であった。これら45種類のタンパク質についてcellular component, molecular functionに基づいたGO解析を行った。45タンパク質のうち64%はextracellular spaceに存在するタンパク質として分類され、分子機能分類ではpeptidase inhibitor activity (50%), serine hydrolase activity (31%), lipoprotein binding (19%)に分類された。

3-2. 糖尿病関連候補タンパク質の経時的測定

表1~4のタンパク質を対象とし、KK-A^yマウス、C57BL/6マウス血清中のタンパク質濃度を測定する目的でMRM法による定量解析を行った。まずiTRAQ解析の際に得られたペプチド同定情報に基づき、MRM測定ペプチド領域の選定を行った。選定に際して酸化メチオニンのような修飾ペプチドを含む領域は除外し、Peptide confidence、ならびにシグナルイオン強度の高いペプチド領域を選定した。1ペプチドにつき5つのトランジションを設定し、コリジョンエネルギー(CE)はペプチドの価数および分子量に基づき算出した値を用いた。予備解析の結果、45タンパク質中34タンパク質に対するペプチド領域がMRM測定可能となり、当該ペプチドの全てのMRMトランジションが同一溶出時間に検出されることを確認した(図2)。作成したMRMトランジションに基づき4週齢のKK-A^yマウス、C57BL/6マウス血清中のタンパク質濃度を測定した結果、iTRAQ発現変動34タンパク質中、17タンパク質の発現変動がMRM解析で検証された(表4)。さらに空腹時血糖異常を呈する12週齢のKK-A^yマウスとC57BL/6マウス血清を用いてMRM測定を行った。8種のタンパク質(Apolipoprotein A-I、Apolipoprotein A-II、Carboxypeptidase N catalytic chain、Clusterin、Inter-alpha-

表 1. C57BL/6 マウスと比較して KK-A^y マウス血清にて発現上昇が認められたタンパク質

Accession number	Entry name	Protein name	Relative protein ratio [#]		KK-A ^y : C57BL/6	p-value
			KK-A ^y	C57BL/6		
Q61147	CERU_MOUSE	Ceruloplasmin	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3	1.5E-02
P42703	LIFR_MOUSE	Leukemia inhibitory factor receptor	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.3	3.5E-02
P11589	MUP2_MOUSE	Major urinary protein 2	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.3	2.9E-02
Q06890	CLUS_MOUSE	Clusterin	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.3	1.4E-02
P08226	APOE_MOUSE	Apolipoprotein E	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.3	4.9E-02
Q6K132	CO3A_MOUSE	Complement component C3 alpha chain	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.7	1.7E-03
P19221	THRB_MOUSE	Prothrombin	1.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.8	3.8E-03
P04683	CO9_MOUSE	Complement component C9	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.8	5.5E-03
P25918	PLKN_MOUSE	Plasminogen	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.7	9.9E-04
P02762	MUP6_MOUSE	Major urinary protein 6	1.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	2.4	6.6E-03
P07759	SPAK_MOUSE	Serine protease inhibitor 3K	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	2.5	6.0E-04
P09813	APOA2_MOUSE	Apolipoprotein A-II	1.8 ± 0.5	0.6 ± 0.2	3.0	2.6E-02
P04186	CFAB_MOUSE	Complement factor B	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	3.2	3.1E-04

表 2. KK-A^y マウス血清でのみ検出・定量されたタンパク質

Accession number	Entry name	Protein name	Relative protein ratio [#]
Q8BH35	CO8B_MOUSE	Complement component C8 beta chain	1.5 ± 0.1
Q8R121	ZPI_MOUSE	Protein Z-dependent protease inhibitor	1.2 ± 0.1
Q9ET66	PI16_MOUSE	Peptidase inhibitor 16	1.4 ± 0.2
Q9WVJ3	CBPQ_MOUSE	Carboxypeptidase Q	1.0 ± 0.1
Q9JN5	CBPN_MOUSE	Carboxypeptidase N catalytic chain	1.0 ± 0.2
P31532	SAA4_MOUSE	Serum amyloid A-4 protein	1.4 ± 0.2
P00920	CAH2_MOUSE	Carbonic anhydrase 2	1.3 ± 0.2
P02535	K1C10_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 10	1.7 ± 0.9
P12246	SAMP_MOUSE	Serum amyloid P-component	1.3 ± 0.2
P52480	KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1.1 ± 0.2
Q5FW60	MUP20_MOUSE	Major urinary protein 20	3.0 ± 0.8
Q61704	ITIH3_MOUSE	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	1.1 ± 0.2

表 3. C57BL/6 マウスと比較して KK-A^y マウス血清にて発現減少が認められたタンパク質

Accession number	Entry name	Protein name	Relative protein ratio [#]		KK-A ^y : C57BL/6	p-value
			KK-A ^y	C57BL/6		
P11859	ANGT_MOUSE	Angiotensinogen	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.6	3.1E-02
P23953	ESTIC_MOUSE	Carboxylesterase 1C	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6	9.6E-04
Q06994	ADIPO_MOUSE	Adiponectin	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.6	1.8E-02
P32261	ANT3_MOUSE	Antithrombin-III	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.7	1.5E-03
Q06677	KNG1_MOUSE	Kininogen-1	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7	1.7E-02
Q00623	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.7	4.5E-04
P21614	VITDB_MOUSE	Vitamin D-binding protein	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.7	7.6E-05
Q86ND5	QSOM1_MOUSE	Sulfhydryl oxidase 1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7	2.9E-03
Q89020	AFAM_MOUSE	A-famin	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8	1.5E-03
Q61730	IL1AP_MOUSE	Interleukin-1 receptor accessory protein	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8	9.8E-03
Q06770	CBG_MOUSE	Corticosteroid-binding globulin	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.8	2.7E-02
P26262	KLKB1_MOUSE	Plasma kallikrein	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8	3.6E-02
Q91X72	HEMO_MOUSE	Hemopexin	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8	4.9E-02
Q61129	CFAI_MOUSE	Complement factor I	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8	4.4E-02
Q01339	APOH_MOUSE	Beta-2-glycoprotein 1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9	1.5E-02

表 4. C57BL/6 マウス血清でのみ検出・定量されたタンパク質

Accession number	Entry name	Protein name	Relative protein ratio [#]
P09581	CSF1R_MOUSE	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	1.2 ± 0.1
Q62351	TFR1_MOUSE	Transferrin receptor protein 1	1.3 ± 0.4
Q8CIF4	BTD_MOUSE	Biotinidase	1.1 ± 0.2
P04939	MUP3_MOUSE	Major urinary protein 3	2.0 ± 0.5

Relative protein ratio: 内部標準に対する比

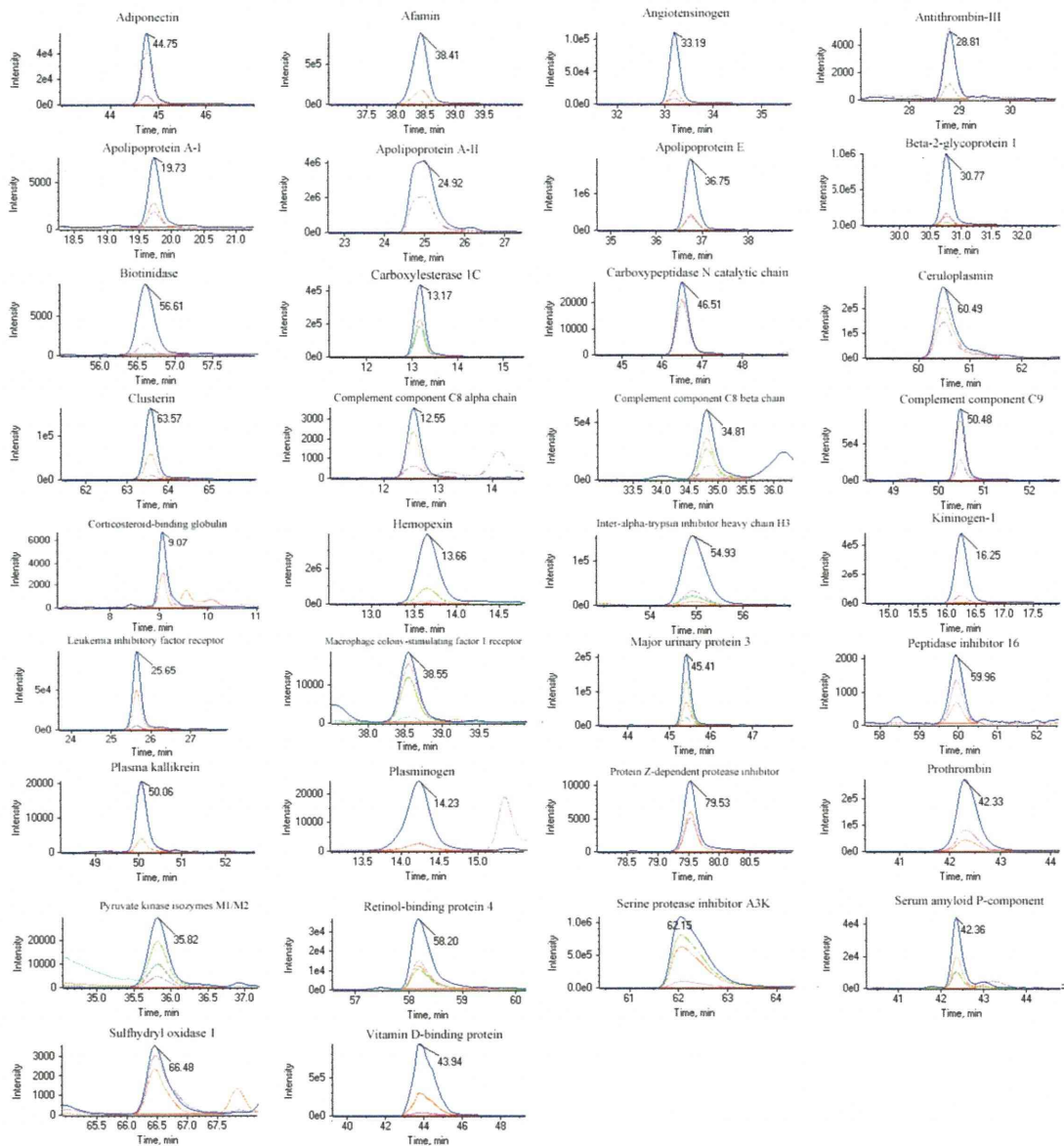


図2. MRM測定が可能であった34タンパク質のextracted ion chromatogram

trypsin inhibitor heavy cha
in 3、Retinol binding prote
in 4、Serine protease inhib
itor A3K (SERPINA3K)、Serum
amyloid P-component 3) が4、

12週齢ともにC57BL/6マウスに
比べKK-A^yマウスで有意な発現変
動を示した。

表 5. KK-A^y マウス (A^y), C57BL/6 マウス (B6) における iTRAQ 変動タンパク質濃度の経時変化。**p* < 0.05.

Accession number	Protein name	Peptide sequence	4 weeks old		12 weeks old	
			A ^y /B6	<i>p</i> -value	A ^y /B6	<i>p</i> -value
Q60994	Adiponectin	AVLFTYDQYQEK	0.74	0.28	0.24	0.01 *
O89020	Afamin	AAPITQYLK	0.85	0.57	1.15	0.48
P11859	Angiotensinogen	TLHDQLVLAIEK	0.78	0.29	1.32	0.24
P32261	Antithrombin-III	TEDGFSLK	0.13	2.E-03 *	1.08	0.81
Q00623	Apolipoprotein A-I	TQVQSVIDK	3.E-04	6.E-06 *	0.08	0.02 *
P09813	Apolipoprotein A-II	THEQLTPLVR	2.83	0.01 *	7.45	3.E-03 *
P08226	Apolipoprotein E	LQAEIFQAR	1.33	0.33	4.32	3.E-04 *
Q01339	Beta-2-glycoprotein 1	YTSFEYPK	0.66	0.25	1.38	0.04 *
Q8CIF4	Biotinidase	GLSSGLVTAALYGR	0.96	0.85	0.97	0.92
P23953	Carboxylesterase 1C	EGASEEETNLSK	0.62	0.32	3.57	0.23
Q9JN5	Carboxypeptidase N catalytic chain	AVIQWIR	1.52	0.04 *	1.92	0.04 *
Q61147	Ceruloplasmin	AGLQAFFQVR	2.29	0.02 *	1.87	0.22
Q06890	Clusterin	ASGHDTLFQDR	1.57	0.02 *	2.24	4.E-05 *
Q8K182	Complement component C8 alpha chain	TEGTTVDEVQK	0.61	0.25	2.37	0.01 *
Q8BH35	Complement component C8 beta chain	ALEEFQSEVSSC[CAM]R	4.78	0.03 *	5.32	0.28
P06683	Complement component C9	AVEDYIDEFSTK	11.07	3.E-03 *	1.42	0.48
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	AGEQINNHVK	0.91	0.82	0.80	0.59
Q91X72	Hemopexin	LYVSSGR	0.79	0.25	1.15	0.49
Q61704	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	SLPEGVVVGIEVYSTK	25.18	3.E-03 *	3.11	0.01 *
O08677	Kininogen-1	QFNPGVK	0.74	0.24	0.94	0.84
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	ITGLVGR	2.85	2.E-04 *	0.60	0.12
P09581	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	ESTSTGIWLK	0.54	0.04 *	0.73	0.31
P04939	Major urinary protein 3	ENIIDLTVNVR	1.09	0.58	1.22	0.55
Q9ET66	Peptidase inhibitor 16	AESPEAEAEPLSSEALVPLPAQER	2.10	4.E-03 *	0.56	0.07
P26262	Plasma kallikrein	SADNLVSGFSLK	0.71	0.49	1.66	0.15
P20918	Plasminogen	TGIGNGYR	3.69	0.03 *	1.60	0.17
Q8R121	Protein Z-dependent protease inhibitor	LILVDYVLFK	2.33	0.04 *	0.95	0.91
P19221	Prothrombin	DNLSPLGQC[CAM]LTER	1.36	0.56	4.19	2.E-03 *
P52480	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	LDIDSAPITAR	4.19	0.04 *	0.85	0.59
Q00724	Retinol-binding protein 4	LQNLDTGTC[CAM]ADSYSFVFSR	2.01	0.01 *	2.26	0.01 *
P07759	Serine protease inhibitor A3K	TLFPSQIEELNLPK	176.70	7.E-04 *	7.54	3.E-04 *
P12246	Serum amyloid P-component	SQSLFSYSVK	11.59	2.E-04 *	85.66	0.04 *
Q8BND5	Sulfhydryl oxidase 1	SYVQFFFGC[CAM]R	0.73	0.48	1.19	0.42
P21614	Vitamin D-binding protein	TQVPEVFLSK	0.87	0.47	1.28	0.25

3-3. SERPINA3 タンパク質の細胞透過性に対する影響の解析

4、12週齢ともにC57BL/6マウスに比べKK-A^yマウス血清において有意な発現上昇を示したタンパク質の一つであるSERPINA3Kは、糖尿病モデルラットの網膜において発現低下することが報告されている。糖尿病、ならびに糖尿病網膜症とSERPINA3Kとの関連を検討する目的で、糖尿病網膜症の発症初期に引き起こされるイベントの一つである血管透過性に対する作

用をSERPINA3KのヒトホモログであるSERPINA3について*in vitro*で検討した。電極上に播種したHRMVECに、SERPINA3タンパク質を添加し、創傷治癒アッセイを行った結果、再度電極を網膜毛細血管内皮層が覆う治癒速度にSERPINA3タンパク質は影響を及ぼさないことが判明した(図3a)。しかし、アッセイ時にHRMVECにSERPINA3を添加後、電気的な創傷を与えるまでの6時間では、SERPINA3未添加群に比べてSERPINA3添加群の細胞のインピ

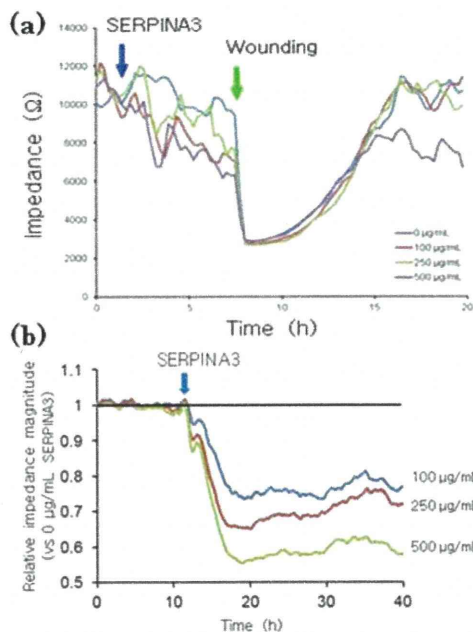


図.3 リアルタイム細胞解析装置による創傷治癒アッセイ。各時間におけるSERPINA3未添加コントロールを1とした時の相対値を示す。

ーダンス値が低下した。SERPINA3タンパク質添加後の経内皮電気抵抗を測定した結果、SERPINA3濃度に依存して網膜血管内皮層に経内皮電気抵抗の低下が観察された(図3b)。ECISモデル化により細胞-細胞外マトリクス間相互作用(α)、細胞膜キャパシタンス(C_m)、細胞間相互作用(R_b)の3成分を算出した結果、経内皮電気抵抗の低下は主に R_b に起因していることがわかった(図4)。

D. 考察

前糖尿病状態のKK- A^y マウスと対照C57BL/6マウス血清を用いiTRAQ法による血清タンパク質の網羅的解析を行った。解析の結果45種のタンパク質に有意な変動が見られ、これらのタンパク質を対象にMRM法により4, 12週齢のKK- A^y マウス、C57BL/6マウスにおける血中濃度を一斉解析した結果、SERPINA3Kを含む7種のタンパク質が4週齢、12週齢共にKK- A^y マウスでC57BL/6に対して有意に増加、1種のタンパク質が有意に減少していた。

これら8タンパク質のうち、本研究では糖尿病網膜症との関連が示されているSERPINA3Kの血管透過性への関与について検討した。培養ヒト網膜血管内皮細胞を用いた*in vitro*解析の結果、SERPINA3KのヒトホモログであるSERPINA3は細胞遊走能、ならびに細胞増殖能に影響を与えなかったが、細胞間結合を弱める作用が見いだ

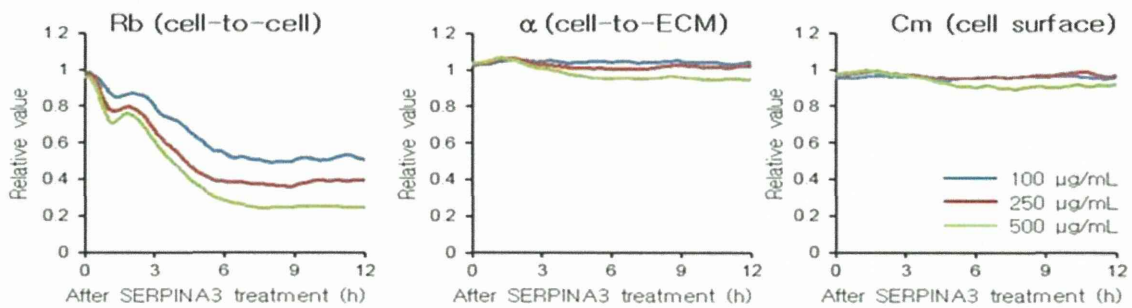


図4 ECISモデル化による検討。Rb:細胞間相互作用、 α :細胞—細胞外マトリックス間相互作用、Cm:細胞キャパシタンス。各時間におけるSERPINA3未添加コントロールを1とした時の相対値を示す。

された。これらの結果は、SERPINA3が網膜血管内皮細胞の透過性を亢進させる働きがあることが示している。一方、ヒト2型糖尿病患者、糖尿病網膜症患者を対象に血清SERPINA3濃度をELISA法により測定したところ、血清濃度の中央値はそれぞれ186.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=40)、191.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=36)であり、健常人(175.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=42))に比べて2型糖尿病群、糖尿病網膜症群での濃度上昇が認められた。糖尿病発症初期からの血中SERPINA3濃度の上昇が血管内皮細胞の透過性を亢進させることにより網膜細小血管における血液網膜関門の破綻や周皮細胞の細胞死、網膜血管内皮細胞の増殖・遊走を促し、非増殖性糖尿病網膜症や

黄斑浮腫の病態形成に關与する可能性が考えられる。

IPAネットワーク解析によりSERPINA3K発現は酸化ストレス応答性の転写因子Nfe2l2/Nrf2により制御される可能性が示された(図5)。糖尿病の主徴である持続的な高血糖は酸化ストレスを亢進させ細胞障害を引き起こすことから、Nfe2l2/Nrf2活性亢進によりSERPINA3Kをはじめとする糖尿病関連遺伝子の発現が変動する可能性が考えられる。最近、Lep^{ob/ob}マウスや白色脂肪細胞特異的Nfe2l2/Nrf2ノックアウトマウスを用いた解析からNfe2l2/Nrf2がインスリン抵抗性の惹起に關与することが報告された。Nfe2l2/Nrf2により発現制御さ

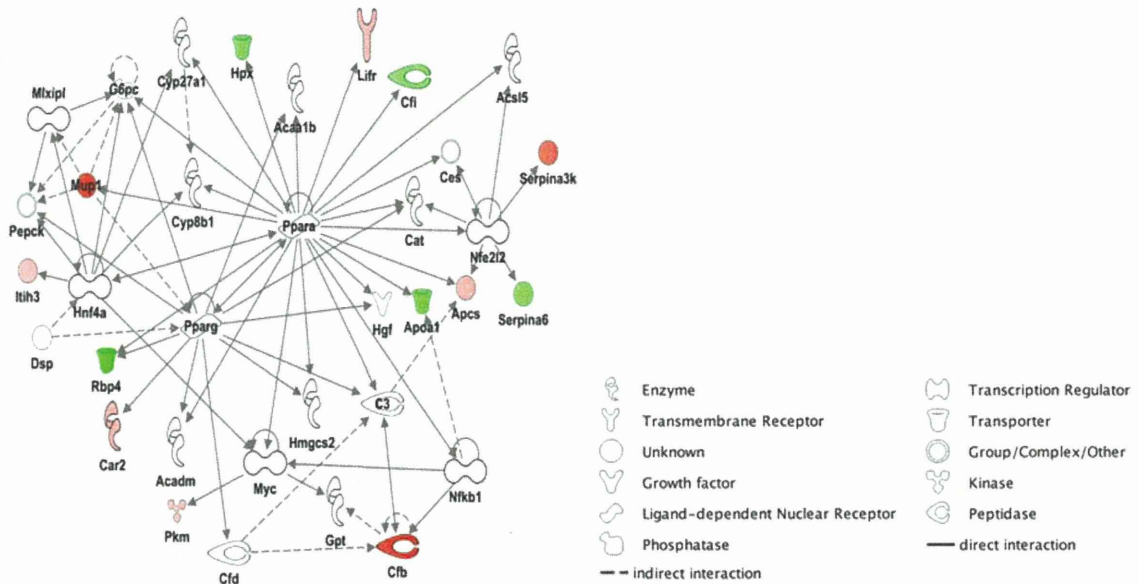


図5. 糖尿病モデル-非糖尿病マウス間で発現差異を認めたタンパク質の発現変動に基づいてIPAにより予測されるネットワーク

れるSERPINA3Kが2型糖尿病や糖尿病合併症の早期関連因子あるいはこれらの疾患の治療標的になる可能性が期待される。

管内皮細胞の透過性亢進に関与し、2型糖尿病、あるいは糖尿病網膜症の発症・進展予防において新たな創薬ターゲットとなる可能性がある。

E. 結論

KK-A^yマウス血清タンパク質の網羅的解析により発現差異を認めるタンパク質の一つとして前糖尿病状態より発現が亢進するタンパク質SERPINA3Kが同定された。SERPINA3は網膜血

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

Eri Takahashi, Akinori Okumura,

Hiroyuki Unoki-Kubota, Hisashi Hirano, Masato Kasuga, Yasushi Kaburagi; Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK-Ay mouse model using the iTRAQ technique. J Proteomics. 84:40-51, 2013.

学会発表:

高橋枝里、久保田浩之、奥村彰規、佐藤恵美、平野久、鏑木康志。KK-Ayマウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索。第49回日本臨床分子医学会学術集会。2012/4/13-14、京都(2012)。

高橋枝里、久保田浩之、奥村彰規、佐藤恵美、平野久、鏑木康志。KK-Ayマウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索。第55回日本糖尿病学会年次学術集会。2012/5/17-19、横浜(2012)。

Unoki-Kubota H, Takahashi E, Okumura A, Hirano H, Kaburagi Y.

Identification of Differential Proteomes Associated with th

e Development of Type 2 Diabetes in the KK-Ay Mice Using iTRAQ Technique. 9th IDF WPR Congress& 4th AASD Scientific Meeting, 2012/11/24-27, Kyoto (2012).

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

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

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

奥村 彰規、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

糖尿病性網膜症は、成人が中途失明する二大原因のひとつであり、年間約 4000 人の糖尿病患者から光を奪う。そのため、糖尿病性網膜症の発症機序を分子レベルで解明することは、治療法・予防法・診断法の開発につながり、その意義は高い。

これまでに本研究室で行った糖尿病モデルラットの血清プロテオーム解析から、有意に亢進した血中タンパク質群のなかに、パラログのタンパク質 SerpinA3K および SerpinA3N が見出された。これらは、ヒトで単一遺伝子 SERPINA3 であり、糖尿病における機能解析は、未だなされていない。

そこで本研究において、まず、ヒトの糖尿病と SERPINA3 の関連を ELISA で確認した結果、糖尿病性網膜症患者では健常者に比べて血清中の SERPINA3 レベルは有意に高くなることが明らかとなった。次に糖尿病性網膜症に注目して、SERPINA3 の網膜毛細血管に対する生理的作用を nano LC-MS/MS 解析およびリアルタイム細胞解析装置で探索した。これらの解析から、SERPINA3 は、糖尿病性網膜症の血管新生に関与は見られないが、網膜毛細血管の内皮細胞透過性を亢進させる働きがあることを見出した。糖尿病性網膜症では、網膜毛細血管内皮細胞が障害を受けることで網膜細小血管の器質的変化が起こる前から、網膜毛細血管の透過性が亢進することが明らかとなっている。そのため、SERPINA3 は糖尿病性網膜症の初期発症プロセスに作用すると考えられ、糖尿病性網膜症の初期段階での治療に有効な創薬ターゲットとバイオマーカーを探索するために、これまでにない観点からアプローチする手掛かりが得られた。