

A. 研究目的

日本における糖尿病患者数は、年々増加しており、現在、成人の5人に1人が糖尿病であるか糖尿病予備軍であるとされている。この糖尿病に特有な合併症として、糖尿病性細小血管障害があり、遺伝因子と環境因子が複雑に絡み合う多因子疾患である。この細小血管障害は網膜症、腎症、神経障害があり、いずれも自覚症状を伴わずに病態が進行するため、なんらかの自覚症状が出た時点では、すでにかなり進行した病状であることがほとんどである。この細小血管症のなかでも、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、現在、年間約4000人の糖尿病患者から光を奪うことから、社会問題にもなっている。ヒトは、外界の情報の80%~90%以上を眼から獲得しているため、失明すると日常生活に最低限必要な基本動作すら著しく制限され、QOLが大きく低下する。

糖尿病性網膜症は、その初期の発症メカニズムとして、慢性的な高血糖により、網膜毛細血管において酸化ストレスの亢進、ポリオール代謝経路の亢進、最終糖化産物の形成と亢進、プロテインキナーゼC活性の亢進が起こることで、浸透圧毒性などによる細胞障害や、基底膜の肥厚、炎症が起こった結果、網膜毛細血管が障害を受けたり網膜周皮細胞が脱落したりして、血液-網膜関門が破綻する。血液-網膜関門の破

綻は、血管透過性の亢進、血管閉塞、血管新生と進行し、最後には網膜剥離により失明に至る。現在、糖尿病性網膜症の診断方法は、糖尿病と診断されたのちに眼科で行う眼底検査のみである。眼底の検査は、散瞳薬や造影剤の投与など患者に少なからぬストレスを与えるものの、ごく微小な病変をとらえるのは困難である。しかし、糖尿病性網膜症は、初期から不可逆的な視神経変性を伴うため、ごく初期に視神経保護を行う必要がある。そこで、初期の糖尿病性網膜症を診断可能とするバイオマーカーの開発は急務となっている。さらに、その治療手段として、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の意義は非常に高く、同時にバイオマーカーの妥当性を判断できる材料にもなりうる。

我々は、これまでにインスリン分泌能低下を主徴とした自然発症糖尿病モデルラット LEA/Sendai ラットの血清プロテオームの解析をおこない、新規の糖尿病早期診断および病態予測マーカーの候補となりうる血清タンパク質の検索を行ってきた。得られた病態予測マーカーのなかで糖尿病状態で血清レベルが亢進する2種類のタンパク質 SerpinA3K および SerpinA3N はパラログであり、ヒトでは Serine peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 3 (SERPINA3) として1種類で存在しており、セリンプロテアーゼとしてだけでなく多

機能であることが近年明らかにされている。しかし、ヒト SERPINA3 の糖尿病における機能についてはほとんど知られていない。そこで今年度は、得られた糖尿病マーカー候補の一つである SERPINA3 について、糖尿病性細小血管障害、特に糖尿病性網膜症との関連を見出し、網膜毛細血管内皮細胞にどのような役割を持つか解析した。

B. 研究方法

1. 血清タンパク質の糖尿病患者血清レベルの評価

研究に使用した血清は、国立国際医療研究センター病院にて、健康診断を受診した

健常者と、糖尿病外来を受診した 2 型糖尿病患者からインフォームドコンセントを得て収集した。年齢、性別、罹病期間等を考慮して、健常者 42 名、合併症なし糖尿病患者 40 名、糖尿病性網膜症と診断された糖尿病患者 32 名由来の血清を選択した（表 1）。血清レベルの測定には、Immunology Consultants Laboratory (Newberg, OR, USA) の Human alpha 1-Antichymotrypsin ELISA Kit を使用し、使用説明の通りに血清を希釈、測定した。

2. 網膜毛細血管内皮細胞の培養

ヒト初代培養網膜毛細血管内皮細胞 (HRMVEC) は Cell Systems (Kirkland, WA, USA) より購入し、I 型コラーゲンコート

表 1. ELISA 測定を行った糖尿病患者および対照健常者の基礎情報

	健常者	糖尿病患者 (合併症なし)	糖尿病性 網膜症患者
人数	42	40	36
(男女比)	(28:14)	(27:13)	(24:12)
年齢	61.0±6.4	65.0±9.6	63.0±7.8
BMI	21.8±2.2	24.2±3.3	25.9±4.3
罹病歴 (年)	—	14.4±8.6	14.8±9.8
空腹時血糖 (mg/dl)	92.1±7.6	135.2±34.8	144.3±49.4
HbA1c (%)	5.6±0.3	7.3±0.8	7.4±1.1
最高血圧 (mmHg)	125.6±14.7	124.0±11.4	135.3±19.8
最低血圧 (mmHg)	79.9±8.2	72.6±9.8	74.9±13.2

したプレート (Iwaki, Tokyo, Japan) に播種し、通常時は EGM2-MV 培地 (Lonza, Basel, Switzerland) にて、37°C、5%炭酸ガス濃度の条件で培養した。細胞の継代は、80%コンフルエントの時に 0.25% trypsin + 0.02% EDTA (Lonza) で細胞を遊離し、Trypsin Neutralization Solution (Lonza) で中和してから遠心洗浄後新しいプレートに播種することで行い、継代数が 7~9 代の時点で実験に供した。

3. SERPINA3 のタンパク質調製

まず、ヒト SEPRINA3 の成熟タンパク質領域をコードする cDNA のクローニングを行った。ヒト肝臓由来 mRNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) から oligo-dT プライマーを使った ReverTraAce (Toyobo, Osaka, Japan) による逆転写反応を行い cDNA を調製した。調製した cDNA をテンプレートとして PCR 法による SERPINA3 遺伝子の増幅を行った。プライマーは、マチュアな SERPINA3 をコードする遺伝子をターゲットとし、N 末端側のプライマーには制限酵素サイトと His-tag を付加したものを、C 末端側のプライマーには制限酵素サイトを付加したものをデザインした。DNA ポリメラーゼは KOD plus Neo (Toyobo) を使用した。アガロースゲル電気泳動で確認した目的の PCR 産物を、QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Chatsworth, CA)

で精製後、dATP 存在下で exTaq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Ohtsu, Japan) 処理し、TA クローニング法でプラスミド pCR2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に組み込み、大腸菌 JM109 (Toyobo) を形質転換した。形質転換体として選別された大腸菌より SERPINA3 遺伝子が挿入されたプラスミド DNA を精製し (QIAprep spin mini kit; Qiagen)、DNA シークエンスによって目的の SERPINA3 遺伝子がクローニングされているかを確認した。DNA シークエンスは、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Life technologies) により Dye terminator 法で蛍光ラベルした試料を ABI3130XL genetic analyzer (Life Technologies) で解析した。DNA 配列を確認後、SERPINA3 遺伝子を pET-21a(+) (Merck Bioscience, Darmstadt, Germany) へ、制限酵素トリガーゼ (Takara Ligation kit; Takara Bio) で組み込み、大腸菌 JM109 株を形質転換した。

つぎに、大腸菌を使った発現系の構築および SERPINA3 の調製を行った。上記のようにして得られたプラスミド DNA で BL21 (DE3) 株を形質転換した。得られた大腸菌を LB/amp 培地で 37°C、振盪培養しながら対数増殖後期まで培養したのち、終濃度 1 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを添加して、20°C で 16 時間 SERPINA3 の発現誘導を行った。培養液から室温、900×g、15 分間の遠心を行うこ

とで大腸菌を集菌し、沈殿した大腸菌を native binding buffer (50 mM NaH_2PO_4 -NaOH (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole) で懸濁した。続いて、終濃度 0.1 mg/ml となるように lysozyme を加えて室温で 30 分間処理し、さらに凍結融解で大腸菌を破砕した。大腸菌液を $5000\times g$ 、15 分間の遠心を行い、得られた上清を溶菌液とした。溶菌液を native binding buffer で平衡化された Ni^{2+} キレートカラム (ProBond; Life Technologies) にアプライし、カラムに対して 5 倍容量の native binding buffer と 5 倍容量の 50 mM NaH_2PO_4 -NaOH (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 60 mM imidazole でカラムを洗浄後、SERPINA3 を 5 倍容量の 50 mM NaH_2PO_4 -NaOH (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole で溶出した。精製したタンパク溶液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対して透析後に、PBS で平衡化済みの Detoxi-gel endotoxin removing column (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) へアプライし、30 分インキュベートの後、通過画分を回収する操作を 5 回繰り返すことで SERPINA3 を精製した。得られた SERPINA3 は、メンブレンフィルターで濃縮し、Bradford 法でタンパク質濃度を測定した後、実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

4. 質量分析装置によるタンパク質の同定

HRMVEC を 0.25% trypsin + 0.02% EDTA 溶液により遊離させた後、6cm ディッシュに 3.5×10^5 個播種して 24 時間後、培地を血清飢餓培地 (0.5%FBS 添加 EBM-2 培地) に交換しさらに 16 時間培養した。終濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう SERPINA3 を添加し 8 時間後の細胞と、コントロールとして PBS のみ添加した細胞を回収した。細胞の溶解方法は、10%トリクロロ酢酸で 30 分間処理した後、100 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 M urea, 12 mM sodium deoxycholate, 12 mM sodium *N*-lauroylsarcosinate で行った。このうちタンパク質量 100 μg をジチオトレイトールおよびヨードアセトアミドによる還元アルキル化処理後、Lys-C (Promega, Madison, WI, USA) 処理を 37°C 、4 時間処理し、続けて Trypsin gold (Promega) を添加して 37°C 、16 時間処理した。反応終了後、酢酸エチル溶液でペプチド試料の溶媒抽出を行い、逆相カラム C18 (Monospin C18; GL Science, Tokyo, Japan) でペプチドの最終精製を行った。

ペプチドを 0.1%トリフルオロ酢酸存在下の 2%アセトニトリル溶液で溶解し、nano LC-MS/MS 解析を行った。nano LC はオートサンプラー HTS-PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) を接続した Paradigm MG4 HPLC システム (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) を用いた。ペプチド試料の分離は、トラップカラムカートリッジ (L-column micro, 5 μm ,

0.3 × 5 mm; Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan) と分離カラム (L-column micro, 3 μm, PEEK coating, 0.1 × 150 mm; Chemicals Evaluation and Research Institute) を組み合わせた逆相 C18 カラムクロマトグラフィーで行い、0.3 μl/min の流速で 0.1% ギ酸存在下、6.4% アセトニトリル濃度を 120 分間かけて 32.8% まで上昇させることで分離を行った。

MS/MS 解析は、上述の分離カラムに Pico tip nanospray emitter (New Objective, Woburn, MA, USA) を接続し、QSTAR Elite mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) で連続的にペプチドを測定することで行った。得られたスペクトルデータを 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS; Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) でペプチドごとに定量比較解析し、Mascot (Matrix Science, Boston, MA, USA) によりデータベース検索することでタンパク質の同定を行った。得られた変量データは分子間ネットワーク/パスウェイ解析データベース Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity, Redwood City, CA, USA) で解析した。

5. リアルタイム細胞解析装置による網膜毛細血管内皮細胞層の経内皮電気抵抗の観察

リアルタイム細胞解析装置は、ECIS Zθ (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) を使用した。創傷治癒アッセイには 8W1E 電極 (Applied Biophysics) を、細胞バリア機能の観察には 8W10E+電極 (Applied Biophysics) をそれぞれ用いた。各電極を 10 mM L-cystein で処理した後、200 μg/mL I 型コラーゲン (Cellmatrix Type I-P; Nitta gelatin, Osaka, Japan) でコーティングを行った。HRMVEC を 0.25% trypsin + 0.02% EDTA 溶液により遊離させた後、各ウェルに EGM2-MV 培地で 1.0×10^5 個播種して 16 時間後、培地を血清飢餓培地 (0.5% FBS 添加 EBM-2 培地) に交換した。創傷治癒アッセイは、血清飢餓培地に交換 8 時間後に、終濃度 0, 100, 200, 500 μg/mL となるよう SERPINA3 を添加して、さらに 6 時間培養した。6 時間の時点で、周波数 60 kHz で 1400 μA の電流を 20 秒間処理することで、電極上の細胞のみを特異的に障害した。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継続して測定した。一方、細胞バリア機能の観察時は、血清飢餓培地に交換 8 時間後に、終濃度 0, 100, 200, 500 μg/mL となるよう SERPINA3 を添加し 12 時間の変動を 11 周波数 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 kHz) で測定した。ECIS モデル化は Giaever らの方法 (Giaever I & Keese CR. PNAS 1991;88:7896-900.) 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) の変動を導いた。

6. 細胞増殖アッセイ

HRMVEC の細胞増殖アッセイは、2 通りの方法で行った。

一つは、上述のリアルタイム細胞解析装置を使った解析を行った。HRMVEC を I 型コラーゲンコートした 8W10E+電極の各ウェルに EGM2-MV 培地で 1.0×10^4 個/cm² になるよう播種して 24 時間後、血清飢餓培地に終濃度 0, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう SERPINA3 を添加した培地に交換した。さらに 24 時間後に SERPINA3 を添加しない通常培地に交換することで SERPINA3 を洗浄除去し、48 時間培養を継続した。全ての過程において 16 kHz でインピーダンス値を連続して測定した。

もう一つは Cell proliferation ELISA, BrdU chemiluminescent (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を使って Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みアッセイを行った。HRMVEC を 0.25% trypsin + 0.02% EDTA 溶液により遊離させた後、I 型コラーゲンコートした 96 ウェル黒色プレート各ウェルに EGM2-MV 培地で 1.0×10^4 個播種して 18 時間後、培地を血清飢餓培地に交換した。血清飢餓培地に交換 6 時間後に、BrdU と終濃度 0, 100, 250,

500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう SERPINA3 を添加し、さらに 18 時間培養した。このようにして BrdU を取り込ませた細胞について、使用説明の通りに操作を行い、化学発光は 2030 ARVO X3 multilabel reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) で測定した。

7. 免疫細胞化学染色

I 型コラーゲンコートされた 8 ウェルチャンバースライド (Iwaki) にコンフルエントになるように HRMVEC を 1.0×10^5 個播種して 16 時間培養後、培地を血清飢餓培地に交換してさらに 24 時間培養した。終濃度 0 または 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう SERPINA3 を添加して、さらに 6 時間培養した。培養後、PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。さらに PBS で洗浄した後、透過処理は 0.1% Triton X-100, 1% Normal Goat Serum を含む PBS で 15 分間処理することで行った。F-actin の染色は Alexa 488-phalloidin (Life technologies) を 1:20 の希釈率で 15 分間、暗中で行った。PBS で 3 回洗浄した後、FluorSave (Merck Bioscience) で退色防止のコーティングを行い、蛍光顕微鏡で観察した (IX71; Olympus, Tokyo, Japan)。

C. 研究結果

1. 血清タンパク質の糖尿病患者血清レベルの評価

まず、糖尿病モデルラットから得られた知見が、ヒト糖尿病患者に反映するかを明らかにするために、ELISA 法による SERPINA3 の血清レベルの測定を試みた。図 1 に示すように、健常者 42 人、合併症がない糖尿病患者 40 人、糖尿病性網膜症がある糖尿病患者 36 人の中央値は、それぞれ 175.8 $\mu\text{g/mL}$ 、186.7 $\mu\text{g/mL}$ 、191.5 $\mu\text{g/mL}$ であった。Turkey-Kramer 法による検定の結果、健常者と糖尿病性網膜症患者の群間で有意な差が認められた。

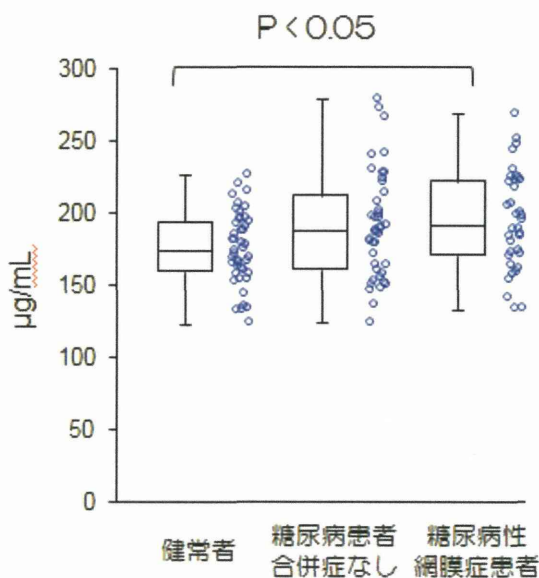


図 1 糖尿病性網膜症患者血清では健常者に比べて SERPINA3 レベルが亢進する。

この結果から、さらに糖尿病性網膜症患者について、糖尿病性腎症を発症しているか否かで SERPINA3 の血清レベルに差がみられるかを検討した結果を図 2 に示す。糖尿病性網膜症のある患者 36 人のうち、糖尿病性網膜症のみの患者は 16 人、糖尿病性腎症を発症している糖尿病性網膜症患者は 20 人であった。ELISA 法の結果から、血清 SERPINA3 の中央値は、糖尿病性網膜症のみの患者 185.7 $\mu\text{g/mL}$ に対して、糖尿病性腎症を発症している糖尿病性網膜症患者 195.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、有意差は認められなかった。これらの結果から、ヒト糖尿病性網膜症において、SERPINA3 の血中レベルは亢進していると考えられる。

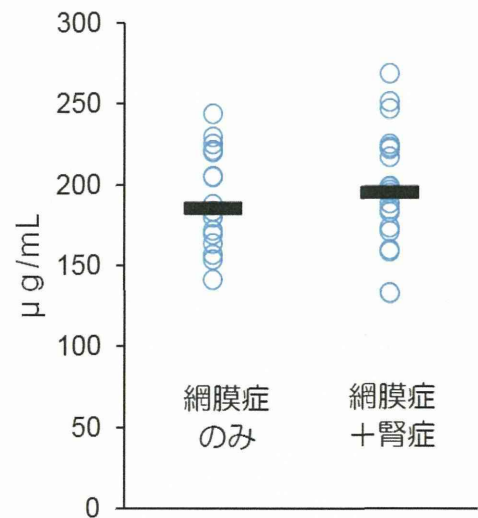


図 2 糖尿病性網膜症患者において糖尿病性腎症を併発しても SERPINA3 の血清レベルは変わらない。

2. 網膜毛細血管内皮細胞に対する SERPINA3 の役割解析—nano LC-MS/MS 解析

糖尿病性網膜症に対する血中 SERPINA3 の役割を明らかにするために、網膜毛細血管内皮細胞に及ぼす影響を探索した。

HRMVEC に、生理濃度である 200 µg/mL SERPINA3 を添加して 8 時間後の細胞を回収して、SERPINA3 未添加のコントロール細胞とともにプロテオミクス解析を行った。Nano LC-MS/MS 解析で測定されたペプチド情報を、2DICAL により定量比較し、mascot 検索により蛋白質同定を行った。その結果、8 時間、200 µg/mL の SERPINA3 処理により HRMVEC 内で 2 倍以上に増加し

たタンパク質は 32 種類 (表 2)、逆に半分以下に減少したタンパク質は 24 種類 (表 3) であった。

これらタンパク質についてどのような作用があるかを IPA で解析を行った。まず変動したものがどういった生理的役割を持つかを Ingenuity ontology で確認した。各 Bio function について regulation Z-score で評価したヒートマップを作成すると、Z-score が 2 以上となる Bio function は得られなかったが、Cellular Movement が亢進する傾向にあった (図 3)。ついで Cell Death の抑制、Immune Cell Trafficking の亢進となっていた。

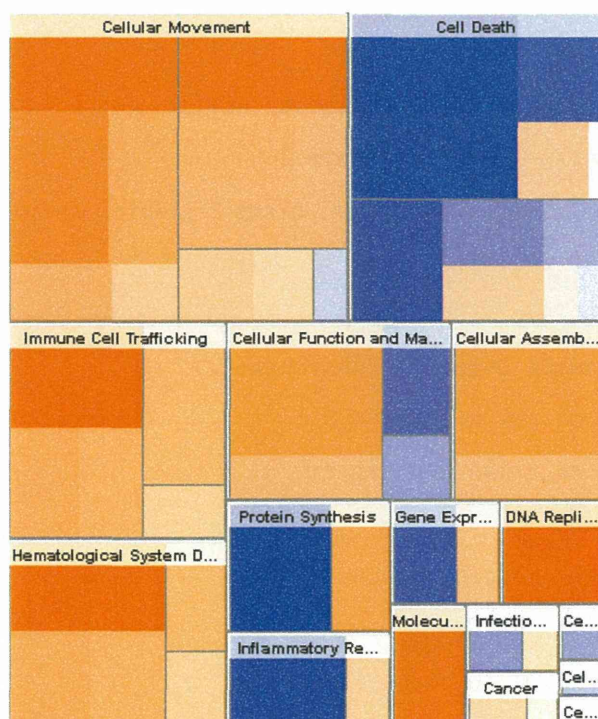


図 3 8 時間の SERPINA3 処理で変動したタンパク質の IPA による Bio function の Ontology 解析。オレンジが促進、青が抑制を示す。

表 2 SERPINA3 処理により HRMVEC 中で 2 倍以上増加した 32 種類のタンパク質

Symbol	Entrez Gene Name	Fold Change
LEG1_HUMAN	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	25.8
VIME_HUMAN	vimentin	15.7
HNRPG_HUMAN	RNA binding motif protein, X-linked	15.6
K2C1_HUMAN	keratin 1	12.8
RS4X_HUMAN	ribosomal protein S4, X-linked	10.9
K1C9_HUMAN	keratin 9	5.5
K2C6B_HUMAN	keratin 6B	4.6
STIP1_HUMAN	stress-induced-phosphoprotein 1	4.1
TPIS_HUMAN	triosephosphate isomerase 1	4.0
BAF_HUMAN	barrier to autointegration factor 1	4.0
CALR_HUMAN	calreticulin	3.9
K1C10_HUMAN	keratin 10	3.7
EIF3C_HUMAN	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	3.6
RLAOL_HUMAN	ribosomal protein, large, P0	3.2
TKT_HUMAN	transketolase	3.1
FLNA_HUMAN	filamin A, alpha	3.0
TADBP_HUMAN	TAR DNA binding protein	3.0
AGLY_HUMAN	ATP citrate lyase	2.8
ACTA_HUMAN	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	2.8
IMB1_HUMAN	karyopherin (importin) beta 1	2.6
PAI1_HUMAN	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	2.4
SMD3_HUMAN	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa	2.4
NNMT_HUMAN	nicotinamide N-methyltransferase	2.4
HSP7C_HUMAN	heat shock 70kDa protein 8	2.3
HSPB1_HUMAN	heat shock 27kDa protein 1	2.3
ANXA5_HUMAN	annexin A5	2.3
RLA2_HUMAN	ribosomal protein, large, P2	2.2
TBA1A_HUMAN	tubulin, alpha 1a	2.1
TBB2C_HUMAN	tubulin, beta 4B class IVb	2.1
ACTN1_HUMAN	actinin, alpha 1	2.1
ML12A_HUMAN	myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric	2.0
IPO7_HUMAN	importin 7	2.0

表 3 SERPINA3 処理により HRMVEC 中で半分以下に減少した 24 種類のタンパク質

Symbol	Entrez Gene Name	Fold Change
TPM3_HUMAN	tropomyosin 3	-44.4
ROA2_HUMAN	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	-31.1
ADT3_HUMAN	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	-25.3
RS3_HUMAN	ribosomal protein S3	-23.6
MYH9_HUMAN	myosin, heavy chain 9, non-muscle	-22.3
CH60_HUMAN	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	-21.5
PRDX1_HUMAN	peroxiredoxin 1	-20.2
GNAI2_HUMAN	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	-12.8
CLH1_HUMAN	clathrin, heavy chain (Hc)	-8.8
ARC1B_HUMAN	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	-7.4
LDHA_HUMAN	lactate dehydrogenase A	-7.0
XRCC5_HUMAN	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)	-7.0
GRP75_HUMAN	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	-6.6
AATM_HUMAN	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	-6.5
KPYM_HUMAN	pyruvate kinase, muscle	-6.2
TCP4_HUMAN	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	-5.7
1433E_HUMAN	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	-5.6
RA1L2_HUMAN	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	-4.0
ADT2_HUMAN	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	-3.0
PSME1_HUMAN	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	-2.7
SET_HUMAN	SET nuclear oncogene	-2.7
H12_HUMAN	histone cluster 1, H1c	-2.5
LDHB_HUMAN	lactate dehydrogenase B	-2.4
TERA_HUMAN	valosin containing protein	-2.3

3. 網膜毛細血管内皮細胞に対する SERPINA3 の役割解析—リアルタイム細胞解析装置による解析

SERPINA3 は HRMVEC の細胞形態に影響を及ぼしていることが考えられる。そこで、リアルタイム細胞解析装置を使った創傷治癒アッセイを試みた。コンフルエントになるように電極上に播種した HRMVEC に、SERPINA3 を添加後 6 時間の時点で、電氣的に創傷を行ったが、図 4 に示すように再度電極を網膜毛細血管内皮層が覆う治癒速度は、SERPINA3 濃度の違いでは変化がなかった。つまり、HRMVEC の細胞遊走能に及ぼす影響はほとんどないと考えられる。

しかし、この創傷治癒アッセイ時に、HRMVEC に SERPINA3 を添加してから電氣的な創傷を与えるまでの 6 時間において、SERPINA3 を添加した群は、明らかに SERPINA3 未添加群に比べてインピーダンス値が低下した。そこで、このインピーダンス値の低下をより詳細に調べるために、細胞のバリア機能に注目した経内皮電気抵抗の測定を行った。

図 5 に示すように、コンフルエントになるように電極上に播種した HRMVEC に、SERPINA3 を添加してから 8 時間は、添加した SERPINA3 濃度に依存して網膜毛細血管内皮層に急激な経内皮電気抵抗の低下が観察され、その後は抵抗が下がった状態で少なくとも 24 時間は維持された。

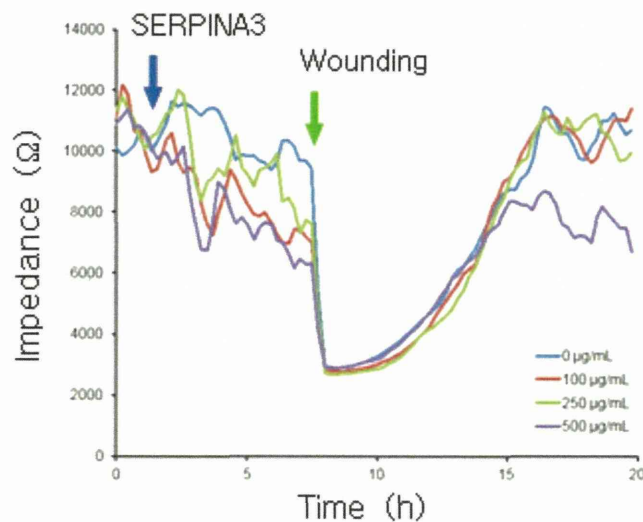


図 4 SERPINA3 は HRMVEC の細胞遊走能には影響を与えない。リアルタイム細胞解析装置による創傷治癒アッセイ (各群 n=3)

このインピーダンス値の低下の原因を調べるため、ECIS モデル化による検討を行った結果を図6に示す。生理的濃度の処理である100および250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSERPINA3処理では、細胞-細胞外マトリックス間相互作用 α や細胞膜キャパシタンス C_m に変化が認められなかったが、細胞間相互作用

Rb だけは大きく低下していた。添加するSERPINA3の濃度を500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇させると若干 α と C_m にも影響が見られるが、経内皮電気抵抗の低下の主原因は、Rbの低下であることがわかった。以上の結果は、SERPINA3にはHRMVECの細胞-細胞間相互作用を弱める働きがあることを示す。

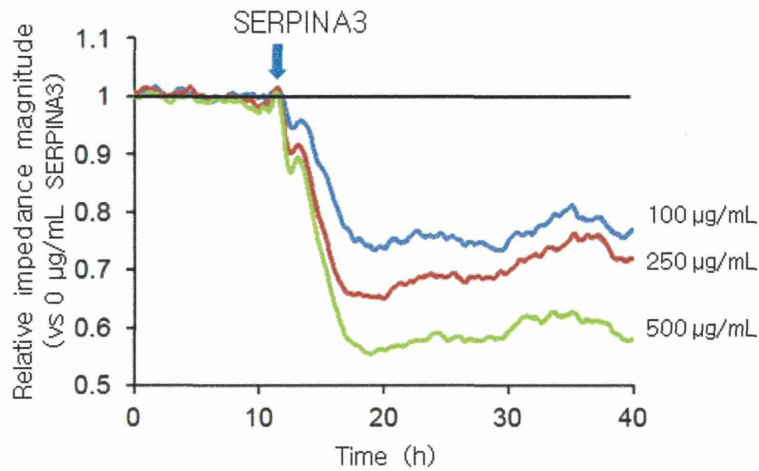


図5 SERPINA3は濃度依存的にHRMVECの経内皮電気抵抗を低くする。リアルタイム細胞解析装置による創傷治癒アッセイ。各時間におけるSERPINA3未添加コントロールを1とした時の相対値を示す(各群n=3)

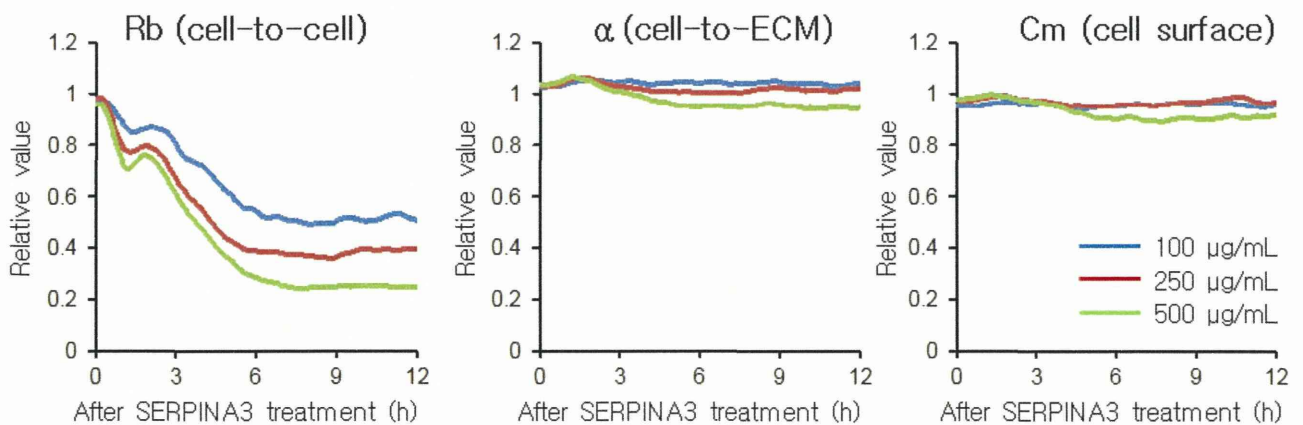


図6 ECISモデル化による検討。Rbは細胞間相互作用を、 α は細胞-細胞外マトリックス間相互作用を、 C_m は細胞膜キャパシタンスを反映する。各時間におけるSERPINA3未添加コントロールを1とした時の相対値を示す(各群n=3)

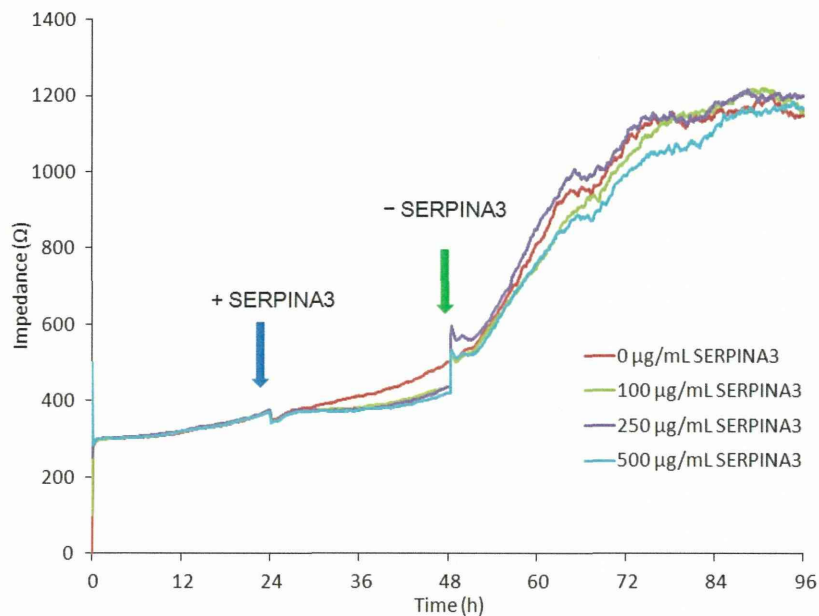


図7 リアルタイム細胞解析装置による細胞増殖アッセイ (各群 n=4)

さらに SERPINA3 が HRMVEC の細胞増殖に影響を及ぼすかについても研究を行った。まず、リアルタイム細胞解析装置に、少数の細胞を播種し、SERPINA3 添加の有無で細胞増殖に影響がないかを測定した (図7)。播種して 24 時間後に SERPINA3 を添加して 24 時間培養を行った結果、SERPINA3 未添加コントロール群のみ顕著にインピーダンス値が上昇し、SERPINA3 添加群はインピーダンス値の上昇がほとんど見られなかった。この時点で、培地を通常培地に戻して培養を行うと、SERPINA3 添加群に急激なインピーダンス値の上昇が見られ、SERPINA3 未添加コントロール群と差が見られなくなった。この結果より、HRMVEC の細胞増殖は SERPINA3 処理により抑制されておらず、インピーダンス値に関与する電極の被覆率が

SERPINA3 処理中だけ抑制されていたと考えられる。細胞は SERPINA3 添加の有無にかかわらず増殖していることを示している。そこで、BrdU ラベルによる DNA 合成量を測定した。その結果、いずれの SERPINA3 濃度でも有意差は認められず SERPINA3 添加の有無は、DNA 合成に関与しないことが明らかとなった。

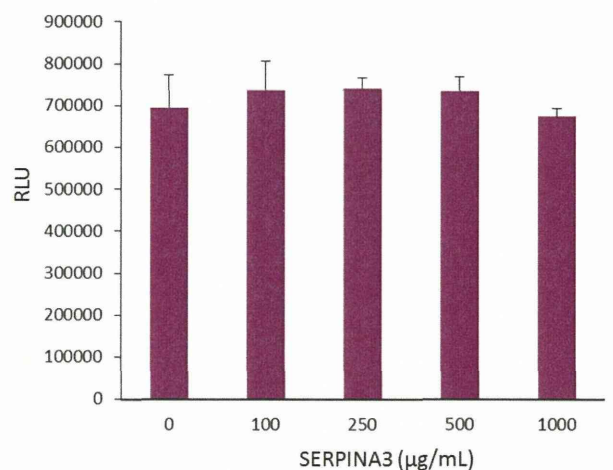


図8 各濃度の SERPINA3 を添加した時の HRMVEC の BrdU アッセイ (各群 n=6)

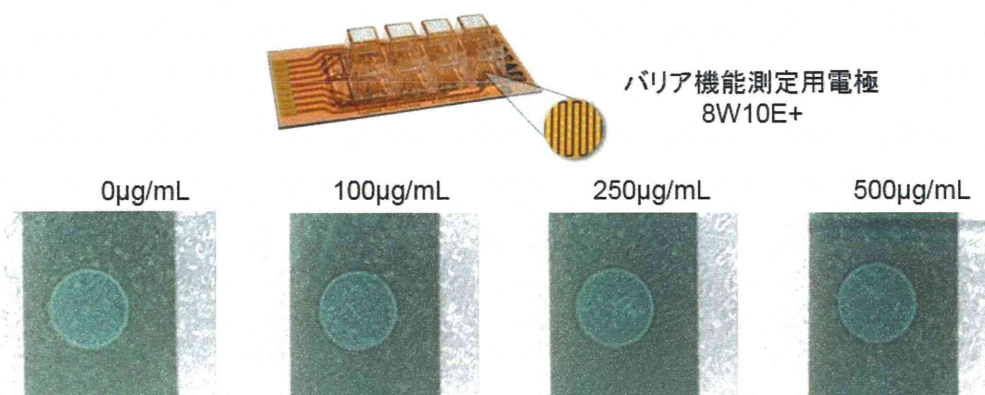


図9 リアルタイム細胞解析装置の電極上にコンフルエントとした HRMVEC に各濃度 (0, 100, 250, 500 µg/mL) の SERPINA3 を添加して 6 時間後の光学顕微鏡像

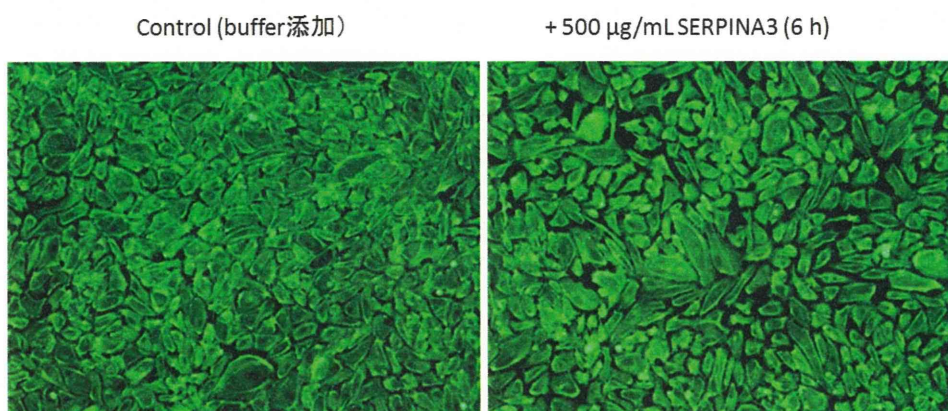


図10 コンフルエント状態にある HRMVEC に SERPINA3 添加して 6 時間後の細胞像 (Alexa488-phalloidin で F-actin 染色)

SERPINA3 が細胞増殖に影響を与えないにもかかわらず、図7の48時間目において (SERPINA3 添加 24 時間後) インピーダンス値に大きく差が見られたことは、細胞の形状が SERPINA3 を添加することで変化している可能性が高い。しかし、図9に示すように通常の光学顕微鏡観察では明確な差異が認められなかった。そこで、詳細に検討するために、SERPINA3 添加時の細

胞の状態を F-actin 染色することで観察した。その結果を図10に示す。SERPINA3 未添加の HRMVEC に比べて、500 µg/mL SERPINA3 を添加した HRMVEC では明らかに細胞間隙が広がっていることがわかる。この結果は、リアルタイム細胞解析装置による ECIS モデル化を行った結果と同様、SERPINA3 によって HRMVEC の細胞-細胞間結合が弱くなることが考えられる。

D. まとめ

本研究では、これまで動物モデルによって得られた知見として SerpinA3K および SerpinA3N は、いずれも糖尿病状態において血清レベルが亢進していることが、ヒトの糖尿病について SERPINA3 で同様となるかをまず確認した。その結果、SERPINA3 については、健常人と合併症がない糖尿病患者では ELISA 法によって差が見られなかった。ただし、糖尿病性網膜症患者では健常者に比べて血清中の SERPINA3 レベルは高くなっていた。しかし、その変動量は今回の結果では 1.1 倍程度であり、糖尿病性網膜症バイオマーカーとしては単独使用での診断は不十分であることも明らかとなった。糖尿病性網膜症のバイオマーカーとして採用する場合は、他マーカーでの診断時に補助的な判断指標として使用が可能であると考えられる。

SERPINA3 の網膜毛細血管に対する生理的作用を探索した。そのうち、網膜毛細血管内皮細胞の創傷治癒アッセイで SERPINA3 添加の有無によって治癒速度に変化がなかったことから、網膜毛細血管内皮細胞の遊走能には影響を及ぼさないと考えられる。また、2通りの細胞増殖能アッセイの結果から、SERPINA3 は細胞増殖能にも影響を及ぼさなかった。これら 2 つ（遊走能および細胞増殖能）は、血管新生に必要な

要因である。よって、SERPINA3 は、糖尿病性網膜症の進んだ段階で見られる新生血管の遊走および細胞増殖に関連しているとは考えにくい。

一方で、SERPINA3 には、網膜毛細血管内皮細胞の細胞-細胞間結合を弱める作用があることを見出した。この現象は言い換えると、網膜毛細血管の内皮細胞の透過性を亢進させる働きをもつと言える。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る。今後、網膜毛細血管内皮細胞の透過性を亢進させるシグナルを詳細に解析し、レセプターなどの同定・解析を行うことで、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の発見につながるはずである。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表：

なし

2. 学会発表：

高橋枝里、奥村彰規、加納圭子、久保田浩之、岡村匡史、平野久、鎗木康志 「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、パシフィコ横浜（横浜）、2011年12月14日、口頭発表

奥村彰規、高橋枝里、久保田浩之、平野久、岡村匡史、鎗木康志 「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、パシフィコ横浜（横浜）、2011年12月14日、口頭発表

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

厚生労働省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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

分担研究者 鏑木 康志 [国立国際医療研究センター・研究所]

研究要旨：多因子疾患である糖尿病について、非肥満型糖尿病モデルラットである LEA/Sendai ラットの血清を用いたプロテオーム解析により新規の糖尿病早期診断及び病態予測のマーカーとなりうるタンパク質の探索を行った。LEA/Sendai ラットおよび非糖尿病ラットである BN ラットから得た血清より血清中の高濃度タンパク質 7 種を除去して試料とし、2D-DIGE 法及び質量分析計によりタンパク質プロファイルを解析した。BN ラットに対し、LEA/Sendai ラットにおいて 243 個のタンパク質スポットが有意な変動を示し、12 個のタンパク質が同定された。糖尿病マーカータンパク質候補の確定には発現変動を示しながら未同定の一部のタンパク質スポットについて分析を進めるとともに、同定されたタンパク質について詳細な解析を進めることが必要である。

A. 研究目的

糖尿病は遺伝因子と環境因子が複雑に絡み合う多因子疾患である。多彩な病像とともに長い期間を経て発症・進展する。そのため、交配や飼育条件の操作を行うことで遺伝因子、環境因子の影響を経時的に調べることができるモデル動物は糖尿病研究において非常に有用な存在である。

我々は非肥満、インスリン分泌能低下を主徴とした自然発症糖尿病モデルラット LEA/Sendai ラットの血清プロテオームの解析により新規の糖尿病早期診断および病態予測マーカーの候補となる血清タンパク質の検索を行った。

B. 研究方法

a) 2D-DIGE 法による糖尿病モデル LEA/SENDAI ラット血清での解析
雄の LEA/Sendai ラットおよび非糖尿病ラットである BN ラットについて 8 週齢、16 週齢より各 4 匹ずつ、計 16 検体の血清を試料とし蛍光ダイファレンスゲル 2 次元電気泳動（2D-DIGE）法により糖尿病ラット、非糖尿病ラット間の血清プロテオームの差異を画像解析した。

b) 質量分析計によるタンパク質の同定

2D-DIGE 法による画像解析の結果、変動の見られたタンパク質スポットについて、タンパク質のゲル内消化・ペプチド抽出後、LC-MS/MS 解析によりタンパク質の同定を行った。

c) 質量分析計によるタンパク質の相対定量

Multiple Reaction Monitoring (MRM)法を用いて2D-DIGE解析により糖尿病-非糖尿病ラット間で変動の見られたタンパク質を質量分析計による相対定量を行った。

C. 研究結果

a) 糖尿病モデルLEA/Sendaiラット血清の2D-DIGE法による解析

雄のLEA/Sendaiラットおよび非糖尿病ラットであるBNラットについて8週齢、16週齢より各4匹ずつ、計16検体から一晩絶食後に採血し、血清を得た。ProteomeLab IgY-R7 Proteome Partitioning Kits (Beckman Coulter)を用いてアルブミン、IgGをはじめとした血清中の高濃度に存在し、解析を阻害するタンパク質7種を除去した。各検体を蛍光標識試薬 CyDye DIGE Fluor, Cy3 minimal dye (GE Healthcare) もしくは Cy5 により標識を行い、すべての試料を混ぜたものを Cy2 で標識し、内部標準とした。以上を、試料とし2次元電気泳動で分離後イメージアナライザーTyphoon (GE Healthcare)により得られた各ゲルデータを2D-DIGE解析用ソフトウェアDeCyder 2D 6.5を用いて糖尿病ラット、非糖尿病ラット間の血清プロテオームの差異を解析した(図1, 2)。

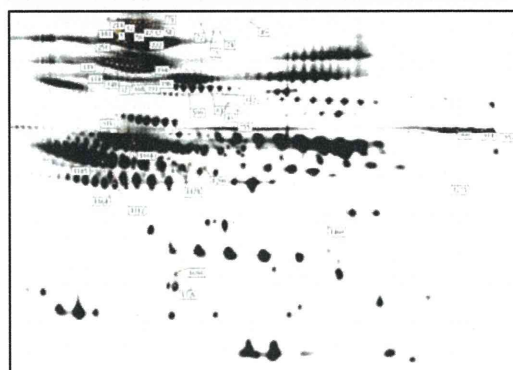
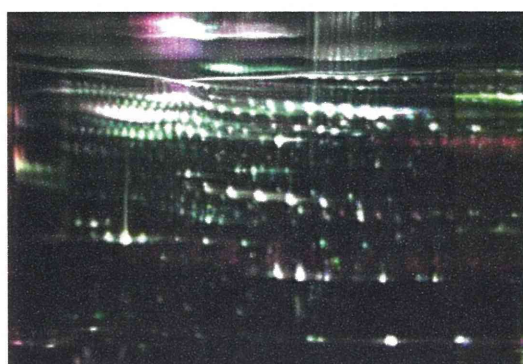


図1. 2D-DIGE法によるLEA/Sendaiラットの血清タンパク質発現プロファイル。

糖尿病モデル-非糖尿病モデル間の比較では、8週齢で存在量に変化が見られたタンパク質スポットは148個、16週齢で変化が見られたタンパク質スポットは204個あり、うち95個が共通して変動を見せた。

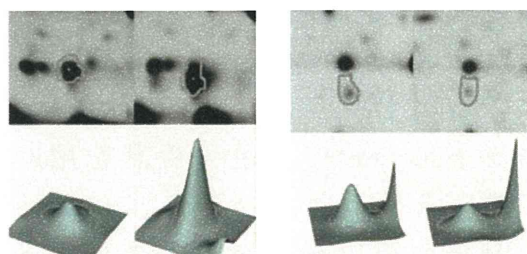


図2. 糖尿病-非糖尿病間で有意に発現変動するタンパク質スポット。

表 1. 糖尿病-非糖尿病ラット間で発現に変動が見られたタンパク質スポットの同定結果

Protein name	Theoretical M.W. (kDa)	Swiss-Prot accession number	Spot No.		Mascot score		p-value		Av. Ratio LEA/SENDAI vs BN	
			8w	16w	8w	16w	8w	16w	8w	16w
Alpha-1-inhibitor 3	165	P14046	-	5	-	313	-	0.01	-	-2.92
			-	32	-	528	-	1.E-04	-	-8.05
			47	47	713	713	2.E-03	2.E-04	-6.33	-6.69
			57	57	546	546	2.E-04	5.E-06	-4.59	-4.05
			58	58	108	108	0.01	3.E-04	-3.12	-2.6
			71	-	490	-	0.02	-	-2.21	-
			183	183	895	895	6E-06	6.E-04	-7.32	-5.73
			214	214	614	614	2.E-04	2.E-03	-5.45	-3.42
			222	222	700	700	3.E-03	0.01	-2.49	-2.26
			253	253	528	528	0.03	0.01	-4.48	-4.23
			319	319	156	156	1.E-03	6.E-04	-8.45	-6.17
			334	334	118	118	6.E-04	6.E-05	-11.16	-9.6
			348	348	431	431	8.E-04	4.E-06	-11.51	-11.75
			372	372	425	425	8.E-04	2.E-06	-10.27	-12.14
			388	388	768	768	7.E-04	7.E-06	-8.27	-10.38
393	393	695	695	5.E-04	2.E-04	-8.45	-7.52			
394	394	501	501	6.E-04	4.E-04	-4.64	-5.52			
396	396	658	658	2.E-03	4.E-03	-3.04	-3.87			
1034	-	395	-	1.E-04	-	-5.5	-			
Alpha-1-macroglobulin	168.4	Q063041	49	49	67	67	0.01	0.05	-2.88	-4.11
Alpha-2-HS-glycoprotein	38.8	P24090	1300	-	116	-	7.7E-05	-	2.29	-
Apolipoprotein E	35.8	P02650	1690	-	554	-	0.04	-	2.59	-
			1726	-	674	-	0.03	-	2.49	-
Complement C3	187.8	P01026	-	755	-	149	-	2.E-03	-	-2.41
Complement C4	193.6	P08649	-	743	-	158	-	1.E-03	-	-2.16
			1460	1460	102	102	0.04	4.E-03	-2.65	-4.34
Liver carboxylase	60.5	P10959	-	916	-	349	-	0.03	-	-2.03
			56	56	766	766	3.E-04	0.01	-6.11	-4.02
			72	-	79	-	0.01	-	-2.16	-
Mucinogobulin-1	166.6	Q03626	74	74	76	76	1.E-03	0.04	-2.56	-2.57
			599	-	319	-	2.4E-05	-	-2.31	-
			612	612	126	126	0.01	7.E-04	5.14	7.72
			617	-	133	-	2.E-03	-	-2.29	-
Mucinogobulin-2	162.9	Q61E52	-	73	-	54	-	0.01	-	-2.2
Plasma glutamate carboxypeptidase	52.1	Q6ERK9	1178	1178	126	126	0.01	1.E-03	2.63	3.04
Serine protease inhibitor A3K	46.8	P05545	1164	1185	810	513	4.E-03	0.01	2.18	2.51
Serine protease inhibitor A3N	46.8	P09006	-	1312	-	944	-	3.E-04	-	2.32

b) 質量分析計によるタンパク質の同定

2D-DIGE 法による画像解析の結果、変動の見られたタンパク質スポットについて質量分析計を用いて同定を行った。

対象となるタンパク質スポットをゲルから切り出し、ゲル切片中で標的タンパク質の還元アルキル化、トリプシン消化後ペプチドを

抽出した。得られた各タンパク質スポットのペプチド溶液を nano-LC と LCQ Deca XP Plus (Thermo Electron) を用いた LC-MS/MS 解析にて標識ペプチドのアミノ酸配列を決定、蛋白を同定した。

48 個のスポットを解析に用い、うち 42 個を同定した。42 個のタンパク質スポットから 12 個のタンパ

ク質が同定された。糖尿病モデル-非糖尿病モデル間の比較では、8週齢で存在量に変化が見られたタンパク質スポット30個から8種のタンパク質を同定した。16週齢においては変化が見られたタンパク質スポットは29個あり10種のタンパク質を同定した。8週齢、16週齢で共通して6種のタンパク質が変動を見せた(表1)。

c) 質量分析計によるタンパク質の相対定量

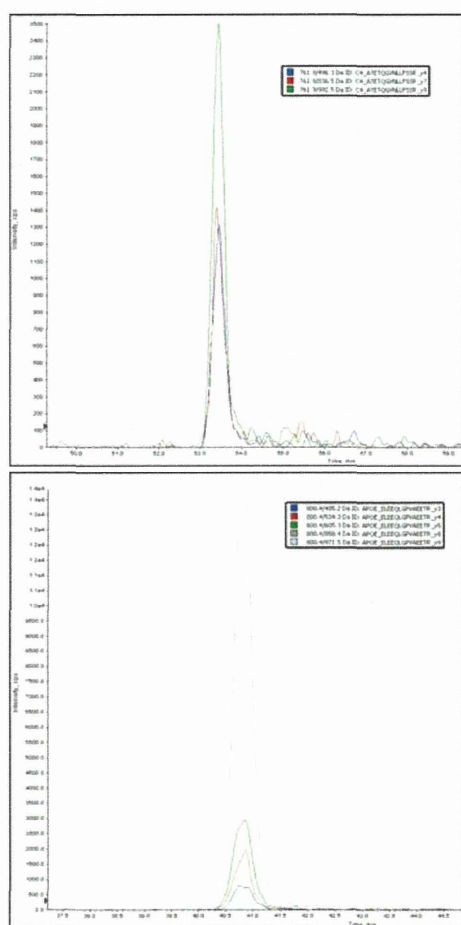


図3. MRM法による標的ペプチド検出例。

質量分析計内でペプチドを開裂前後の質量電荷比による2段階のフィルタリングすることで標的タンパク質のペプチドを特異的に検出する Multiple Reaction Monitoring (MRM)法を用いて、2D-DIGE解析により糖尿病-非糖尿病ラット間で変動の見られたタンパク質を対象に質量分析計による相対定量を行った(図3)。モニタリングのため標的タンパク質のペプチドおよびその開裂断片による二重フィルター(transition)の設定を、標的タンパク質の質量分析計による同定時の情報およびデータベースを元に行い、各 transition のイオン強度を測定した。その結果、Alpha 1 inhibitor 3やApolipoprotein E、Serine protease inhibitor A3Kは8週齢にて2D-DIGE解析と同様に有意な発現変動を示した(図4)。一方で2D-DIGE解析による2次元に分離された際とは異なる結果を示すタンパク質も見られた。

D. 考察

本研究で解析に用いた LEA/Sendai ラットはインスリン分泌不全を主徴とした非肥満型の糖尿病モデルラットである。若齢から耐糖能異常を示し、軽症糖尿病を呈するが高血糖に至る前からインスリン分泌不全が観察されること、加齢とともに緩やかに進展を見せることから糖尿病のごく初期