

図 4. MRM 法による相対定量の結果、糖尿病-非糖尿病ラット間で血清中量に有意差がみられたタンパク質。

の状態の再現が期待できる。今回、糖尿病マーカー候補の探索において同定されたタンパク質は、2D-DIGE 法による解析において複数のスポットに分離・検出されたものが多い。MRM 法を用いた相対定

量によるタンパク質量の変動を解析した結果では、やはり 2次元に分離を行った 2D-DIGE 解析とは異なる結果を示すものがあり、これは翻訳後修飾によるタンパク質の質的な変化が示唆される。また今回同定されたタンパク質の一部については過去の報告で糖尿病との関連が示唆されているものが含まれており、本研究の結果から糖尿病のかなり早い段階から量的あるいは質的な変化をすることが示唆された。

#### E. 結論

糖尿病は遺伝的および環境要因が複雑に絡み合い、その病態は非常に複雑な疾患である。そのため、一定の環境条件、遺伝的コントロールを可能とするモデル動物を用いた解析は本研究が目的とした糖尿病の早期診断や病態予測のマーカー探索に非常に有用である。モデルラット血清を用いた今回の解析では、糖尿病-非糖尿病間で有意に変動を示すタンパク質を同定したがその多くは翻訳後修飾による質的変動をしていることが示唆された。今後の課題としては、バイオマーカー開発の上で必要な情報となるマーカー候補タンパク質の質的変化の解析および変動が検出されながら同定に至らなかったタンパク質、特に低分子領域の微量タンパク質の解析が挙げられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表：

なし

### 2. 学会発表：

Eri Takahashi, Tadashi Okamura,  
Hisashi Hirano, Kazuki Yasuda,  
Yasushi Kaburagi. Proteomic  
analysis of serum proteins in  
diabetic LEA/Sendai rats.  
BMB2010(第33回日本分子生物学会  
年会・第83回日本生化学会大会  
合同大会)ポスター発表, 神戸, 12  
月, 2010

高橋枝里, 奥村彰規, 加納圭子, 久  
保田浩之, 岡村匡史, 平野久, 鏑木  
康志. 血清プロテオーム解析によ  
る2型糖尿病関連因子の探索. 第  
34回日本分子生物学会年会, 口演,  
横浜, 12月, 2011

## 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

#### 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

分担研究者 野田 光彦

国立国際医療研究センター病院

糖尿病研究連携部 部長

#### 研究要旨

【目的】わが国の主要な疾患の一つである糖尿病について、患者由来臨床検体でのプロテオーム解析により、糖尿病関連蛋白のデータベース構築、新規バイオマーカー及び創薬ターゲットの発見に資することを目的とする。 【方法】前計画の「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において、本施設にて収集した糖尿病患者124例、健常者42例からの血清にてcICAT法を用いた定量解析を行い、多変量解析を用いた合併症予測を試みた。 【結果】合併症のない糖尿病患者では、健常者と比較して28個の蛋白が有意に変動していたが、1.5倍以上の変動を示す蛋白は認められなかった。糖尿病性合併症を有する患者血清では各合併症で異なる血清蛋白プロファイルが見られたが、いずれも変動の幅が小さかった。また、定量解析可能な蛋白の組み合わせについて、 $k$ 近傍法を用いた糖尿病性合併症の有無の判別を試みて、比較的少数の蛋白の変動の組み合わせで糖尿病性合併症の有無を判別することがある程度可能であった。 【考察】cICAT法での少数例の解析で、糖尿病の病態によって血清蛋白プロファイルが異なることが示唆された。今後、cICATデータと臨床情報を組み合わせた上での多変量解析、多数の蛋白が定量可能なiTRAQ法を用いた多数の血清サンプルでの再解析が必要である。

## A. 研究目的

糖尿病患者は2006年国民健康・栄養調査では約820万人といわれ、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。

従来の研究において、糖尿病性細小血管症のバイオマーカーについては、例えば糖尿病性腎症を含む慢性腎疾患(CKD)では少数の既存のバイオマーカーのパネル化による病態管理が試みられているが、糖尿病性細小血管症で確立されたシングルマーカーはほとんどなく、単独あるいは複数のバイオマーカーの組み合わせでの病態評価は困難な段階にある。そこで本研究では、今回得られた健常者及び糖

尿病患者血清のcICAT解析で得られた蛋白プロファイルを多変量解析することによって、糖尿病性細小血管症の出現を予測可能かについて検討した。

## B. 研究方法

・糖尿病患者血清及び臨床情報の収集及びcICAT法での解析

今回の「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、我々は国立国際医療センターに通院する糖尿病患者（124例）及び健常者（42例）から臨床情報を収集すると共に、糖尿病関連蛋白のデータベース構築のために血清を採取した。血清は創薬プロテオームファクトリー施設にて高発現蛋白除去カラムにて処理後に、同施設のLC-MS/MSを用いたcICAT法にて糖尿病に関連した蛋白の同定、相対定量を行った。今回の解析について、定量された蛋白の変動パターンから糖尿病性合併症の有無を多変量解析にて判定するために、主成分分析で傾向の異なる蛋白をグループ分けし、t検定で有意な変動を示す蛋白を選別した。さらに選別された蛋白の組み合わせにて、k近傍法を用いて、糖尿病性合併症の有無の判別を試みた。

## C. 研究結果

・糖尿病患者血清及び臨床情報

「疾患関連たんぱく質解析研究事業」

において、糖尿病診断マーカーの解析に使用するために収集した血清サンプルの中で、糖尿病患者88人、健常者42人を今回のcICAT法での解析に用いた（図1）。

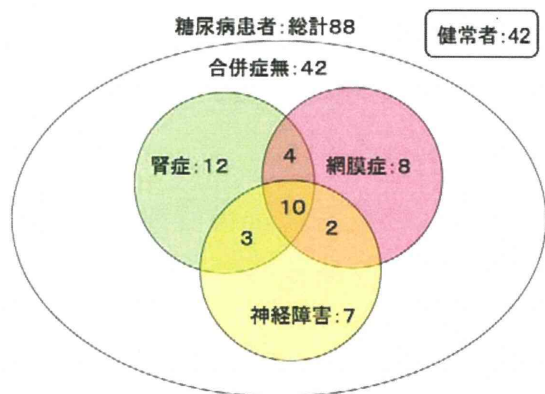


図1. cICAT法で解析した糖尿病患者の分類

・ cICAT法での糖尿病患者血清の解析

創薬プロテオームファクトリー施設にて、上記の糖尿病患者及び健常者由来血清を用いてcICAT法による高発現血清蛋白の定量解析を行った。その結果、血清中の高発現蛋白63種類について定量情報が得られた（図2）。これらの蛋白の1/3は補体関係の蛋白であり、1/6は凝固関係、残りの半分弱は脂質代謝、細胞接着、輸送等に関与する蛋白やその他の蛋白で構成されていたが、これらの蛋白の中で、糖尿病患者血清にて健常者と比較して50%以上変動する蛋白は認められなかった。

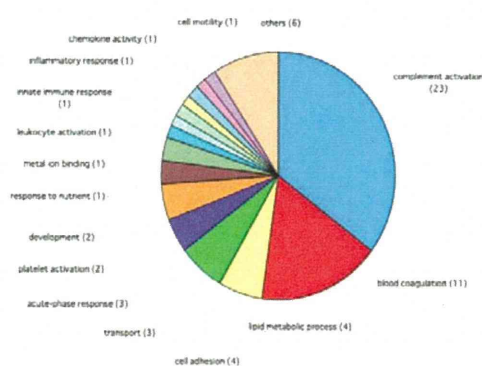


図2. cICAT法により定量された血清蛋白（総計63種類）の内訳

健常者と、合併症のない糖尿病患者及び各糖尿病性合併症の単独合併患者の比較では、各合併症にて血清蛋白プロファイルは異なるパターンを呈するものの、各合併症で固有な変動を示す蛋白は認められず、また合併症のない糖尿病患者においても30個の蛋白が有意に変動していた（図3）。

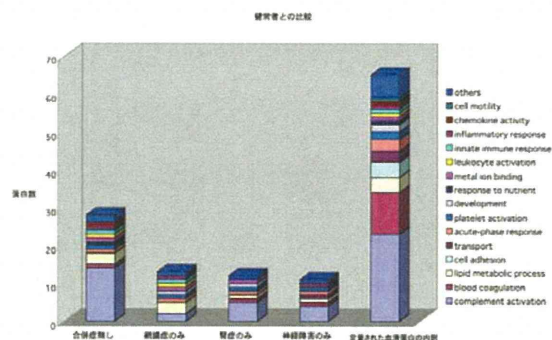


図3. 健常者と糖尿病患者の血清蛋白プロファイルの比較

糖尿病性合併症のない糖尿病患者と糖尿病性合併症を有する患者の比較では、腎症のみで6個、網膜症のみで6個、神経障害のみで15個の蛋白が有意に変動しており、その一部は各合併症間で重複していたが、い

れの蛋白も変動の幅が小さく、単独のマーカ候補になりうる蛋白は認められなかった（図4）。

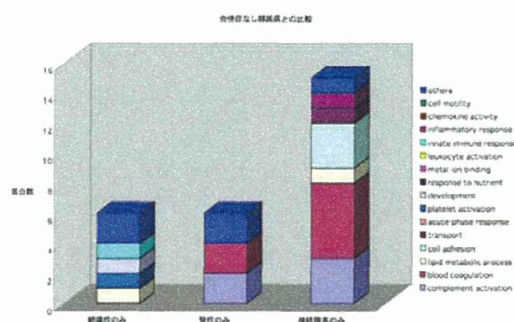


図4. 各合併症単独 vs 合併症なし糖尿病患者での血清蛋白プロファイルの比較

我々は加齢による血清蛋白プロファイルへの影響についても検討するために、健常者、合併症のない糖尿病の各群で年齢層別の比較を行ったが、有意に変動した蛋白は各群にて異なることから、糖尿病で変化している蛋白は単に加齢によって変動する蛋白ではなく、糖尿病に関連した変動であることが示唆された（図5）。

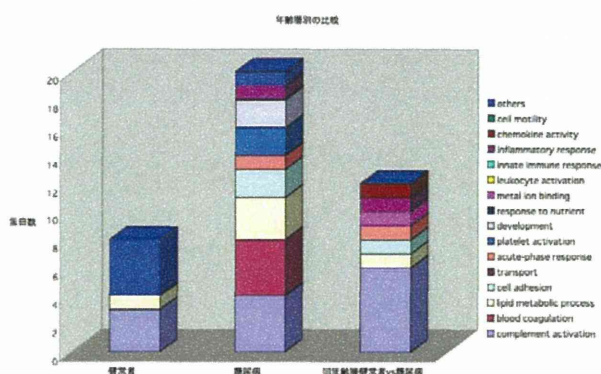


図5. 健常者、糖尿病患者での年齢層別比較及び同年齢層での健常者 vs 糖尿病患者での比較

我々は今回の解析データを用いて、定量された蛋白の変動パターンから糖尿病性合併症の有無を多変量解析にて判定することを試みた。具体的には、主成分分析で傾向の異なる蛋白をグループ分けし、t検定で有意な変動を示す蛋白を選別した。さらに選別された蛋白の組み合わせにて、*k*近傍法を用いて、糖尿病性合併症の有無の判別を試みた。その結果、比較的少数の蛋白の変動を組み合わせることによって、糖尿病性合併症の有無を判別することがある程度可能であった（表1）。

		Classified Groups	
		健常者+糖尿病・合併症無し	糖尿病・合併症有り
True Groups	健常者+糖尿病・合併症無し	10 (62.5%)	6 (37.5%)
	糖尿病・合併症有り	2 (9.5%)	19 (90.5%)

表1. *k*近傍法での血清蛋白5種類からの糖尿病性合併症の判別結果

#### D. 考察

前計画の「疾患関連たんぱく質解析研究事業」にて、当施設から創薬プロテオームファクトリー施設に発送した糖尿病患者血清及び健常者血清を用いたcICAT法による解析の結果から、糖尿病及び糖尿病性細小血管症に関連して変動する一群の蛋白を同定することができた。これらの蛋白で1.5倍以上の変動をしていた蛋白はなく、特定の病態を単独で診断可能なバイオ

マーカー候補は発見できなかった。今後の検討では、血清蛋白の網羅的定量解析の結果と臨床情報を多変量解析等の手法で検討することによって、疾患あるいは病態に固有な蛋白プロファイルのパターンを検索していく。

#### E. 結論

ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、糖尿病患者由来検体の網羅的同定を行い、病態に関連した蛋白を検索することは、新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発のために意義のある試みと考える。今回の解析では、比較的少数の糖尿病患者由来血清及び尿の解析によって、糖尿病及び合併症によって有意に変動する蛋白を多数同定することができた。今回の研究計画では、解析する検体数の増加、より多数の蛋白の定量が可能なiTRAQ法に解析法を変更、検体収集する際に糖尿病性合併症及び大血管症について客観的情報との組織的な取得、得られた蛋白プロファイルと臨床情報からの多変量解析による多面

的解析等が挙げられる。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

論文：

Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park K S, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* (2008) 40, 1092-1097

Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K,

Takeda J, Kasuga M. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. J Clin Endocrinol Metab. (2008) 93, 3136-3141

Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. J Mass Spectrom Soc Jpn. In press

学会発表：

楠木康志. 糖尿病におけるプロテオミクス研究の現状と今後の展望. 第35回BMSコンファレンス, 口演, 2008年7月、  
裏磐梯

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

I. 研究協力者：

加藤昌之（国際協力医学研究振興財団 主任研究員）



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

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  
鏑木 康志

独立行政法人国立国際医療研究センター  
研究所 糖尿病研究センター  
臓器障害研究部

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

## A. 研究目的

糖尿病患者は 2007 年国民健康・栄養調査では約 890 万人といわれ、戦後一貫して増加している。糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を引き起こすことであり、網膜症では失明、腎症では腎不全による人工透析、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断に帰結し、国民健康上大きな問題になっている。これらの合併症は自覚症状を伴わないで進行するため、病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断するバイオマーカーの開発が急務である。また、新規バイオマーカー発見は糖尿病合併症の早期発見のみならず、合併症発症の機序解明、合併症予防薬開発にとっても必要である。

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

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

## B. 研究方法

### 1. 解析対象検体

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

なお、本研究の実施に当たり事前に国立国

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

## 2. 血清ペプチドの調製

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

## 3. LC-MS/MS 解析

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

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

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

PCA 分離に寄与する蛋白質を抽出した。

#### 4. MRM 定量解析

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

積を解析した。

#### 5. 統計学的解析

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

### C. 研究結果

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

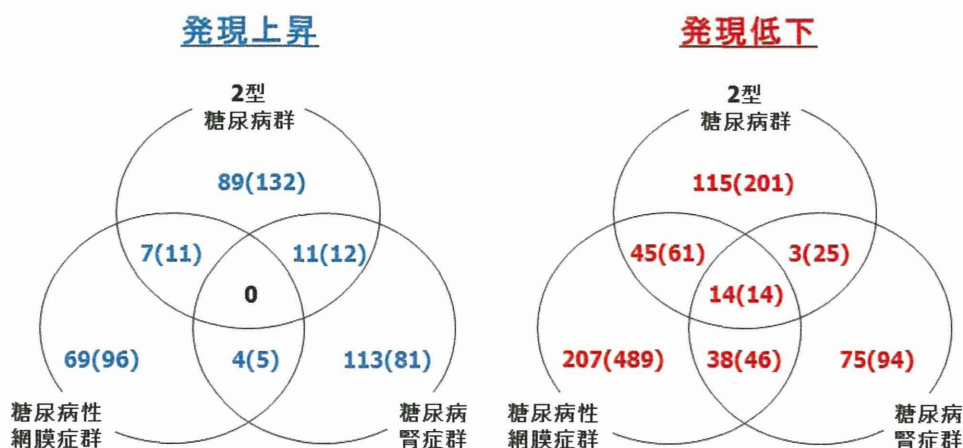
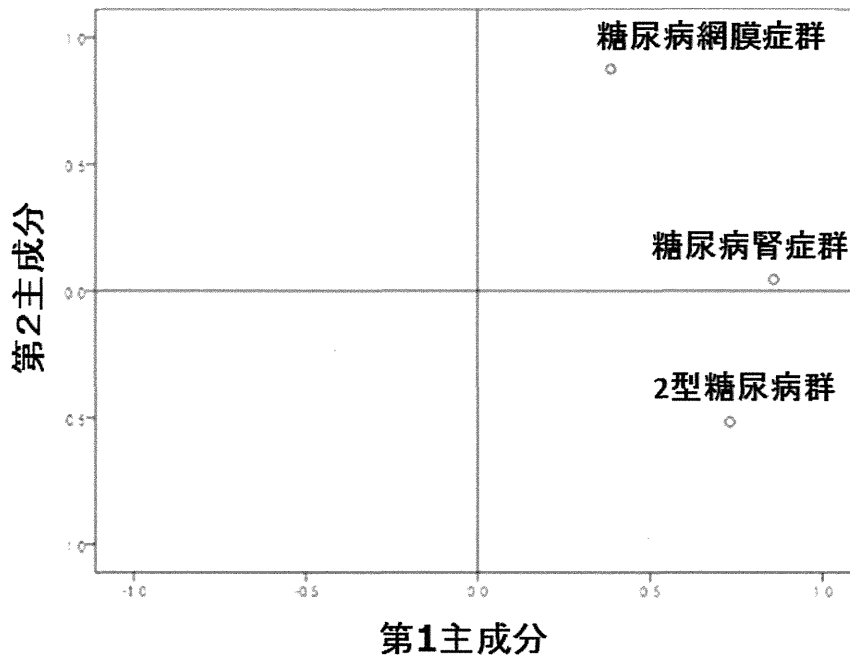


図1 健常人群に対して3倍以上発現変動した蛋白質数



**図2 PCAのスコアプロット**

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

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

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

#### D. まとめ

厚生労働省が2007年度に発表した糖尿病実態調査によると、わが国には予備軍まで含めて推定2210万人の糖尿病患者が存在し、今や成人の5人に1人が何らかの糖代謝の異常を持つと推定されている。糖尿病性細小血管症を併発する患者数も増加しており、効率的な治療法や予防法の開発が望まれる。糖尿病や糖尿病性細小血管症の状態を詳細に反映するマーカーが見いだされれば、効率的な治療法や予防法の開発において大きな役割を担うことが期待される。本研究では糖尿病や糖尿病性細小血管症の発症・進展に関連する因子の探索対象を血清としたが、血清は日常診療において多くの病気の診断に用いられる有用な検体であり、かつ検体採取が簡易でコストが低くて済むという利点を持つ。一方で血清にはアルブミン、IgG、凝固線溶系因子を始めとする血中濃度

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

カーとしての意義を検証する必要がある。

なし

2. 実用新案登録

#### E. 結語

なし

3. その他

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

なし

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

なし

学会発表:

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

表1 解析対象患者の臨床データ

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

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

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



表2 第2主成分係数 $\geq |1.5|$ の蛋白質

UniProt ID	DM/H	DR/H	DN/H	FAC1_1	FAC2_1
HEMO	1.80E+00	4.50E-02	8.50E-01	5.44	-3.8
CO4A	1.60E+00	1.60E-03	3.30E-03	3	-3.61
AMBP	1.20E+00	2.30E-03	4.50E-03	2.11	-2.74
AMBP	1.20E+00	2.30E-03	4.50E-03	2.11	-2.74
SAMP	1.10E+00	2.60E-04	1.10E+00	4.34	-2.45
CERU	1.00E+00	4.20E-03	1.00E-02	1.79	-2.4
CFAH	1.10E+00	1.40E-04	9.10E-01	3.9	-2.4
IRF7	9.90E-01	1.70E-03	1.60E-03	1.63	-2.29
SAMP	1.00E+00	2.00E-04	9.10E-01	3.76	-2.28
KS6A6	1.00E+00	3.10E-04	9.00E-01	3.66	-2.21
A1BG	9.90E-01	1.40E-04	1.20E+00	4.18	-2.13
AACT	9.70E-01	1.00E-04	9.60E-01	3.7	-2.09
AFAM	9.50E-01	1.60E-04	7.70E-01	3.24	-2.09
VTDB	8.60E-01	3.30E-04	1.90E-01	1.74	-1.98
CFAI	8.40E-01	1.20E-04	4.90E-02	1.39	-1.95
CO4A	8.80E-01	6.80E-03	6.50E-01	2.83	-1.93
HEMO	7.90E-01	6.90E-04	3.50E-04	1.17	-1.85
FMO4	8.00E-01	4.40E-03	1.70E-02	1.23	-1.85
IGHA1	8.00E-01	1.00E-02	4.60E-03	1.21	-1.82
IGHA1	8.00E-01	1.00E-02	4.60E-03	1.21	-1.82
ZA2G	8.30E-01	8.10E-05	8.20E-01	3.07	-1.81
IGHA1	8.40E-01	1.60E-04	8.70E-01	3.2	-1.81
CFAH	8.30E-01	3.10E-04	7.90E-01	2.99	-1.81
CFAH	7.60E-01	2.00E-03	1.40E-01	1.41	-1.75
KNG1	7.50E-01	1.60E-04	3.20E-03	1.08	-1.75
SAMP	7.50E-01	1.40E-02	2.10E-03	1.09	-1.69
CO4A	7.20E-01	2.00E-03	8.60E-03	1.03	-1.68
ITIH2	7.00E-01	1.00E-03	2.90E-03	0.96	-1.64
CO4A	7.20E-01	6.10E-04	3.90E-01	1.86	-1.63
A1BG	7.10E-01	5.70E-04	2.50E-01	1.52	-1.62
CLUS	7.20E-01	4.90E-04	7.60E-01	2.67	-1.57
A1BG	7.30E-01	3.10E-04	8.70E-01	2.93	-1.56
CERU	7.30E-01	1.60E-04	8.90E-01	2.97	-1.56
CLUS	7.30E-01	8.10E-04	8.90E-01	2.98	-1.56
CO4A	6.80E-01	7.90E-04	2.80E-01	1.52	-1.55
SV421	7.10E-01	3.10E-04	7.10E-01	2.54	-1.55
CBG	7.10E-01	1.00E-03	7.00E-01	2.53	-1.55
CFAH	7.10E-01	2.60E-04	9.80E-01	3.14	-1.5
KV302	4.20E-03	3.70E-01	1.50E-01	0.16	1.51
FETUA	4.40E-01	6.10E-01	1.30E-03	1.2	1.52
MILK2	1.90E-03	3.70E-01	3.00E-03	-0.15	1.53
KNG1	1.10E-03	3.40E-01	8.80E-01	1.73	1.53
VTDB	1.60E-03	3.80E-01	1.80E-01	0.24	1.56
ITIH4	2.00E-03	3.90E-01	3.30E-01	0.6	1.65
THBG	2.50E-03	4.00E-01	3.40E-01	0.64	1.67

UniProt ID	DM/H	DR/H	DN/H	FAC1_1	FAC2_1
AFAM	3.70E-04	4.20E-01	4.10E-03	-0.09	1.7
HCD2	1.70E-03	4.20E-01	1.10E-03	-0.09	1.71
APOA4	3.90E-03	4.20E-01	1.40E-04	-0.09	1.71
IC1	9.00E-04	4.30E-01	8.80E-02	0.11	1.76
CO4A	2.60E-04	4.30E-01	1.20E-04	-0.08	1.76
CFAI	9.60E-04	4.20E-01	5.10E-01	1.02	1.78
KV201	1.00E-02	4.20E-01	1.00E+00	2.13	1.85
CO8A	1.80E-04	4.40E-01	3.00E-01	0.6	1.85
CO4A	3.50E-04	4.40E-01	4.60E-01	0.95	1.9
ITIH2	6.30E-04	4.60E-01	1.80E-02	0.01	1.92
APOH	5.30E-03	4.60E-01	3.60E-01	0.78	1.94
ITIH4	3.30E-02	5.00E-01	5.60E-03	0.1	1.99
ATS5	7.30E-04	5.10E-01	9.20E-04	0.03	2.09
APOH	2.80E-01	6.60E-01	3.00E-02	0.97	2.13
ANT3	5.50E-04	5.50E-01	3.30E-04	0.08	2.27
K0415	5.40E-03	5.60E-01	3.00E-03	0.11	2.3
CXCL7	2.80E-03	5.50E-01	6.70E-01	1.57	2.38
CO4A	3.50E-03	5.60E-01	4.80E-01	1.17	2.4
ITIH1	2.00E-03	5.80E-01	3.60E-01	0.92	2.45
CO4A	4.40E-03	6.40E-01	4.40E-01	1.18	2.71
A1BG	1.10E-01	7.10E-01	1.50E-02	0.6	2.71
ITIH1	1.60E-03	6.60E-01	5.90E-04	0.23	2.72
HPTR	3.90E-03	6.60E-01	9.00E-03	0.26	2.73
CFAH	3.70E-03	6.70E-01	6.40E-01	1.67	2.9
CFAB	1.00E-04	7.10E-01	2.50E-01	0.84	2.99
CXCL7	5.10E-04	7.60E-01	3.50E-04	0.37	3.17
THBG	8.10E-05	7.40E-01	7.60E-01	2.03	3.22
ANT3	2.30E-03	7.90E-01	6.30E-01	1.81	3.38
APOH	2.90E-04	8.20E-01	9.30E-01	2.49	3.56
ANGT	2.20E-02	8.70E-01	4.90E-03	0.59	3.6
IGKC	5.80E-03	8.60E-01	6.50E-01	1.95	3.68
ANT3	4.10E-05	8.60E-01	7.20E-01	2.09	3.7
TSN14	1.10E-03	8.90E-01	5.10E-04	0.56	3.73
ZA2G	4.10E-03	9.00E-01	5.10E-01	1.71	3.85
ZA2G	6.70E-04	9.10E-01	8.50E-01	2.47	3.96
ITIH1	3.30E-03	9.90E-01	5.10E-01	1.81	4.24
KNG1	1.60E-03	9.50E-01	2.00E+00	5.08	4.29
TMEM5	2.10E-02	1.10E+00	1.70E-02	0.91	4.54
SAMP	9.50E-03	1.10E+00	1.10E+00	3.34	4.94
LGI1	6.80E-01	1.50E+00	1.00E-03	3.03	4.98
AACT	1.60E-04	1.10E+00	1.50E+00	4.2	5.01
CO4A	1.30E-03	1.20E+00	7.30E-01	2.57	5.14
AACT	1.30E-03	1.40E+00	7.80E-01	2.92	5.89
CERU	2.40E-04	1.40E+00	1.20E+00	3.9	6.27
IC1	5.90E-03	1.80E+00	9.20E-01	3.89	7.89

表 3 MRM 測定対象タンパク質と MRM 測定設定値

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

表4 MRM 定量解析の結果

	Healthy subjects		Type 2 DM		Diabetic retinopathy		Diabetic nephropathy	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Afamin	6.3E+05	6.0E+05	1.2E+06	7.0E+05*	4.8E+05	4.8E+05	4.9E+05	3.1E+05
$\alpha$ -1-antichymotrypsin	6.9E+06	4.1E+06	5.1E+06	3.1E+06	2.9E+06	2.0E+06*	3.8E+06	3.5E+06
Alpha-1B-glycoprotein	7.0E+06	3.8E+06	9.1E+06	3.5E+06	6.7E+06	3.3E+06	7.7E+06	3.5E+06
Alpha-2-antiplasmin	2.9E+05	3.4E+05	2.0E+05	4.2E+05	3.7E+04	5.4E+04	1.3E+05	3.4E+05
Angiotensinogen	2.4E+06	8.0E+05	2.3E+06	9.3E+05	1.7E+06	7.2E+05	1.9E+06	7.0E+05
Antithrombin-III	6.6E+05	3.9E+05	1.1E+06	2.9E+05*	6.5E+05	5.0E+05	7.8E+05	4.6E+05
ApolipoproteinCI	5.6E+05	5.9E+05	2.9E+05	4.4E+05	1.9E+05	2.7E+05	2.2E+05	4.6E+05
ApolipoproteinCIII	8.2E+05	6.1E+05	1.4E+06	9.4E+05	1.4E+06	1.3E+06	1.5E+06	1.4E+06
ApolipoproteinE	1.0E+06	8.0E+05	5.1E+05	4.4E+05	3.2E+05	3.8E+05	4.1E+05	6.5E+05
$\beta$ 2-GlycoproteinI	3.6E+06	4.0E+06	2.0E+06	3.2E+06	1.1E+06	1.8E+06	1.7E+06	3.6E+06
Ceruloplasmin	1.8E+06	1.2E+06	1.1E+06	6.5E+05	6.6E+05	5.4E+05*	7.7E+05	6.0E+05
Clusterin	7.4E+05	2.6E+05	5.5E+05	2.9E+05	4.2E+05	2.8E+05	4.3E+05	2.9E+05*
Coagulation factor Xlla HC	3.2E+06	1.4E+06	3.3E+06	1.7E+06	2.1E+06	1.7E+06	2.2E+06	1.1E+06
Complement C4 $\beta$	3.2E+06	1.4E+06	3.3E+06	1.4E+06	2.8E+06	1.4E+06	3.0E+06	1.2E+06
Complement C4 $\gamma$	4.3E+06	2.2E+06	4.5E+06	1.8E+06	4.0E+06	2.4E+06	4.4E+06	2.0E+06
Gelsolin	9.1E+05	6.9E+05	5.7E+05	5.2E+05	3.2E+05	3.0E+05	4.9E+05	7.2E+05
Hemopexin	1.4E+08	2.7E+07	1.6E+08	3.4E+07	1.4E+08	3.4E+07	1.5E+08	3.6E+07
Heparin cofactor II	6.6E+05	6.9E+05	6.7E+05	5.4E+05	3.1E+05	3.7E+05	4.1E+05	5.2E+05
Inter-alpha-trypsin inhibitor HC	2.4E+06	1.8E+06	1.6E+06	1.5E+06	7.7E+05	7.4E+05*	1.1E+06	1.5E+06
Kallistatin	3.6E+05	1.4E+05	5.2E+05	1.5E+05*	4.4E+05	1.5E+05	4.3E+05	1.4E+05
Kininogen-1	7.4E+06	3.2E+06	1.1E+07	4.5E+06	7.9E+06	3.2E+06	8.8E+06	4.1E+06
L-selectin	3.0E+05	1.2E+05	1.9E+05	7.5E+04	1.3E+05	7.7E+04	1.4E+05	7.4E+04*
Pigment epithelium-derived factor	3.5E+05	2.4E+05	4.0E+05	2.4E+05	2.2E+05	2.1E+05	3.0E+05	2.4E+05
Plasma retinol-binding protein	2.1E+06	9.4E+05	2.4E+06	7.9E+05	2.4E+06	9.8E+05	2.8E+06	1.6E+06
Plasminogen	4.4E+05	3.9E+05	6.8E+05	5.4E+05	4.0E+05	4.1E+05	4.0E+05	3.5E+05
Prothrombin	1.2E+05	6.2E+04	1.3E+05	5.1E+04	9.1E+04	5.2E+04	8.4E+04	4.9E+04
Serum amyloid P-complement	1.6E+06	5.3E+05	2.7E+06	5.5E+05*	1.7E+06	5.6E+05	2.0E+06	9.3E+05
Transthyretin	1.7E+07	7.2E+06	1.7E+07	4.9E+06	1.4E+07	5.5E+06	1.7E+07	8.3E+06
Vitamin D-binding protein	1.1E+07	2.5E+06	1.2E+07	2.3E+06	1.2E+07	2.9E+06	1.2E+07	2.2E+06
Vitronectin	1.2E+06	9.1E+05	2.1E+06	1.0E+06	1.2E+06	9.7E+05	1.6E+06	1.4E+06
Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein	2.4E+06	9.8E+05	2.4E+06	7.6E+05	2.4E+06	7.8E+05	3.0E+06	1.4E+06

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

表5 糖尿病性細小血管症群と関連を示した蛋白質の血清濃度と臨床データとの相関解析

	Serum amyloid P-complement		Ceruloplasmin		L-selectin	
	R value	P value	R value	P value	R value	P value
Sex	-.457**	<.001	.106	.411	.072	.576
Age (year)	-.295*	.020	-.007	.956	-.080	.539
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	.142	.357	-.151	.328	-.159	.304
T2DM Duration (year)	.155	.228	-.199	.121	-.281*	.027
SBP (mmHg)	-.214	.103	-.009	.946	-.004	.977
DBP (mmHg)	-.190	.150	.216	.101	.269*	.039
Fasting glucose (mg/dL)	.294*	.021	-.156	.230	-.206	.111
HbA1c (%)	.260*	.041	-.252*	.048	-.302*	.017
TC (mg/dL)	-.238	.074	.219	.102	.249	.062
TG (mg/dL)	.234	.071	-.153	.243	-.215	.098
HDL (mg/dL)	-.332*	.010	.051	.699	.095	.472
AST (U/l)	.101	.495	.092	.535	.102	.488
ALT (U/l)	.216	.100	-.053	.690	-.027	.837
γ-GTP (U/l)	.150	.275	-.088	.523	-.069	.615
eGFR (mL/minute per 1.73 m <sup>2</sup> )#	.009	.947	.030	.819	.009	.945
Albumin Creatinin ratio (mg/g Cre)#	-.214	.143	-.005	.972	-.111	.454

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$