

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

6. サイトカインLECT2と糖尿病関連疾患との関連解析

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

糖尿病性細小血管障害は、高血圧、高トリグリセリド血症、低 HDL コレステロール血症など糖尿病関連疾患とも強い関連性がある。これらの環境下においては、脂肪組織、筋組織、肝臓などの感受性やタンパク質発現が変動しており、複雑な相互作用がみられる。

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は肝臓で産生される血中タンパク質であり、その機能の一つとして炎症の調節因子があると考えられているが、糖尿病関連疾患についての研究報告はない。そこで、本研究では、糖尿病関連疾患として肥満および脂肪肝について LECT2 の血中レベルがどのように変動するかを 231 人の人間ドックの被験者の血清サンプルを使って縦断的に調査した。その結果、肥満および脂肪肝で血清 LECT2 レベルは亢進することが見いだされ、新規の肥満関連因子であることを見出した。

A. 研究目的

糖尿病における細小血管障害は、最も深刻な合併症であるにもかかわらず自覚症状がなく進行する。その原因、発症機序について、これまで多くの研究がなされ、徐々に明らかになりつつあるが、いまだ効果的な治療法が確立できたとは言い難い状況であり、さらなる研究が必要である。その理由の一つに、細小血管障害は、糖尿病そのものだけでなく、関連疾患である肥満、高血圧、脂質異常症からも大きく影響を受けており、複雑な発症メカニズムを形成していることが挙げられる。

糖尿病関連疾患のうち、肥満に関してはいくつかの組織が量的・質的变化を起こすことで知られている。代表例では、脂肪細胞の増加および肥大化、アディポカイン産生レベルの変化である。特に最近、肥満に関して注目される組織として、脂質代謝を行う中心的な臓器である肝臓が挙げられる。食事で摂取された脂肪は、小腸で分解されて脂肪酸として血中を流れ、肝臓に送られる。しかし、糖分・脂質の過剰摂取が続き、肝臓に送られる脂肪酸量が増えると、肝臓内に中性脂肪が蓄積し、質的变化を起こした脂肪肝となる。この脂肪肝の原因としては、多くは肥満、糖尿病、アルコールの過剰摂取が挙げられ、自覚症状がなく、主に健診時の超音波エコーによる診断で発見される。脂肪肝ではサイトカインや成長因子

の発現も変動していることが報告されており、炎症性サイトカインの亢進と抗炎症性サイトカインの低下は、糖尿病患者において BMI などの身体計測値や血糖値、ヘモグロビン A 1 c (HbA1c) などとも相関があることが報告されている。さらに、脂肪肝から質的变化が起こると肝炎、肝硬変、肝がんへと進行することから、脂肪肝の状態を把握することは重要である。

LECT2 (Leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、好中球走化性因子のスクリーニングで同定された分子量 16kDa のサイトカイン様のタンパク質である。この LECT2 は、肝細胞で特異的に産生され、血中に分泌されている。LECT2 の構造的機能解析は遅れていたが、分子内にある 3 つのジスルフィド結合の様式が決定され、亜鉛結合タンパク質で亜鉛イオンが LECT2 の安定化に寄与することを明らかにしている。また、結晶化にも成功した報告があり、立体構造も間もなく解明されると期待されている。この LECT2 の生体内での機能は LECT2 遺伝子欠損マウスにより解析されつつあり、肝炎のマウスモデルの一つであるコンカナバリン A 誘導性肝炎、関節リウマチモデル、トキシックショックモデルではいずれも野生型に比べて重篤化することから、LECT2 は抗炎症性の機能を持つのではないかと考えられている。また LECT2 は、魚類からヒトまで、広くその存在が確認されており、魚類においても細菌感染時に肝臓内で最も

発現亢進するタンパク質の一つとして注目されている。

このような LECT2 が、慢性炎症がおこる肥満状態や、質的变化が起こった脂肪肝の状態では血中濃度がどのような挙動を示すか報告がない。そこで、本研究では、糖尿病関連疾患として、肥満と脂肪肝に着目し、血中 LECT2 レベルと肥満・脂肪肝の関連性を探索した。

B. 研究方法

1. 研究対象

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、人間ドックを受診した被験者からインフォームドコンセントを得て収集した。年齢は 40–69 歳、がん・糖尿病・高血圧・脂質異常症の罹患・服薬をしていない 231 人（男性 113 人、女性 118 人）を選択した（表 1）。血清 LECT2 濃度以外の身体計測値、生化学データについては、人間ドックの受診時のデータを採用した。

2. 血清 LECT2 濃度の測定法

ヒト LECT2 濃度の測定は、血清レベルの測定には、血漿用の ELISA キットである Ab-Match ASSEMBLY Human LECT2 kit（医学生物学的研究所）を使用し、測定プロトコルを一部改変し血清用に適応しなおして測

定した。

3. 統計解析

得られたデータの統計解析については IBM SPSS Statistics version 20 (IBM Corp., Armonk, NY) と R version 2.8.1 (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>) を使用した。正規分布の検定は Shapiro-Wilk 検定を行い、2 群間の比較は Student の t 検定で行った。LECT2 と身体計測、および健診データの相関解析は Pearson の相関係数、および Spearman の順位相関係数でそれぞれ検討した。多重回帰解析を行う際には、トリグリセリド、HDL コレステロール、C 反応性タンパク、AST、ALT、 γ -GTP は正規分布に近づけるよう対数変換した値を使用した。なお、 P 値が 0.05 未満を統計的に有意であるとした。

表1. Clinical characteristics of the study subjects

	Men	Women	<i>P</i> value
n	113	118	
LECT2 (ng/ml)	43.6 ± 12.9	43.4 ± 14.3	NS
Age (yr)	55.0 ± 8.9	55.1 ± 8.4	NS
W/Ht	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.06	NS
WHR	0.91 ± 0.05	0.88 ± 0.07	<0.001
BMI (kg/m ²)	23.4 ± 2.7	21.1 ± 3.0	<0.001
Waist circumference (cm)	84.7 ± 7.9	78.1 ± 8.9	<0.001
Body fat (%)	21.5 ± 4.3	25.5 ± 6.0	<0.001
Systolic blood pressure (mm Hg)	124.8 ± 16.1	119.5 ± 15.4	0.011
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80.1 ± 10.3	72.7 ± 11.0	<0.001
Total cholesterol (mg/dl)	211.1 ± 32.5	224.5 ± 38.3	0.005
Fasting triglyceride (mg/dl)	118.3 ± 58.5	86.8 ± 46.8	<0.001
HDL-cholesterol (mg/dl)	60.2 ± 15.5	73.7 ± 17.8	<0.001
LDL-cholesterol (mg/dl)	127.0 ± 28.4	126.9 ± 34.7	NS
Fasting glucose (mg/dl)	93.8 ± 9.1	90.7 ± 9.5	0.012
HbA1c (%)	5.6 ± 0.3	5.6 ± 0.3	NS
hs-CRP (mg/dl)	0.163 ± 0.585	0.067 ± 0.152	<0.001
Uric acid (mg/dl)	6.2 ± 1.1	4.6 ± 1.1	<0.001
White blood cell (10 ³ /μl)	5.77 ± 1.31	4.90 ± 1.36	<0.001
Platelet (10 ⁴ /μl)	22.2 ± 4.6	23.9 ± 5.0	0.007
AST (IU/l)	23.9 ± 6.6	21.9 ± 5.3	0.013
ALT (IU/l)	23.5 ± 9.0	19.6 ± 8.2	<0.001
γ-GTP (IU/l)	44.6 ± 32.6	26.1 ± 19.1	<0.001
Alkaline phosphatase (IU/l)	202.0 ± 44.5	217.1 ± 62.2	0.034
Blood urea nitrogen (mg/ml)	14.1 ± 3.1	13.3 ± 3.6	NS
Serum creatinine (mg/dl)	0.85 ± 0.13	0.64 ± 0.11	<0.001
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	76.2 ± 14.4	76.2 ± 14.3	NS
<i>Diagnosis (%)</i>			
Obesity (W/Ht ≥ 0.5)	63 (55.8)	50 (42.4)	0.042
Chronic kidney disease (eGFR < 60)	8 (7.1)	13 (11.0)	NS
Alcohol consumption (> 20 g/day)	75 (66.4)	38 (32.2)	<0.001
Fatty liver (by ultrasonic)	56 (49.6)	27 (22.9)	<0.001

C. 研究結果

1. 被験者の臨床情報解析

まずは、ウエスト-身長比 (W/Ht) を基準に肥満・非肥満に分けて被験者群を確認すると、113 人 (49%) と 118 人 (51%) に分けられ、ほぼ半数になった。男女で比較を行うと、表 1 に示すように、平均 W/Ht は 0.5 と差がみられなかった。しかし、Body Mass Index (BMI) で比較すると男性のほうが高く、体脂肪率で比較すると女性のほうが高い結果となった。さらに、高血圧、脂質異常症、高尿酸血症に関与する因子は男女で差がみられた。また、83 人は超音波エコー診断で脂肪肝と診断されており、男性は女性の約倍の発生率であった。これは一日 20 g 以上のアルコール摂取者も男性が 2

倍ほど高いことと一致していた。これらの傾向は、国民健康・栄養調査結果と類似した結果となっており、一般的な日本人の身体計測・生化学検査の分布を反映した被験者群であるといえる。

2. 血清 LECT2 濃度と身体計測値との比較

被験者 231 人分の血清 LECT2 レベルを ELISA によって測定した結果、男女で平均濃度差はみられず、正規分布に従った分布となり、全体として平均 43.5 ± 13.6 ng/ml であった。4 種の身体計測値 - BMI、腹囲 (WC)、ウエスト-ヒップ比 (WHR)、W/Ht について血清 LECT2 との相関を調べた結果、いずれにおいても男女とも正の相関を示した (図 1、表 2)。

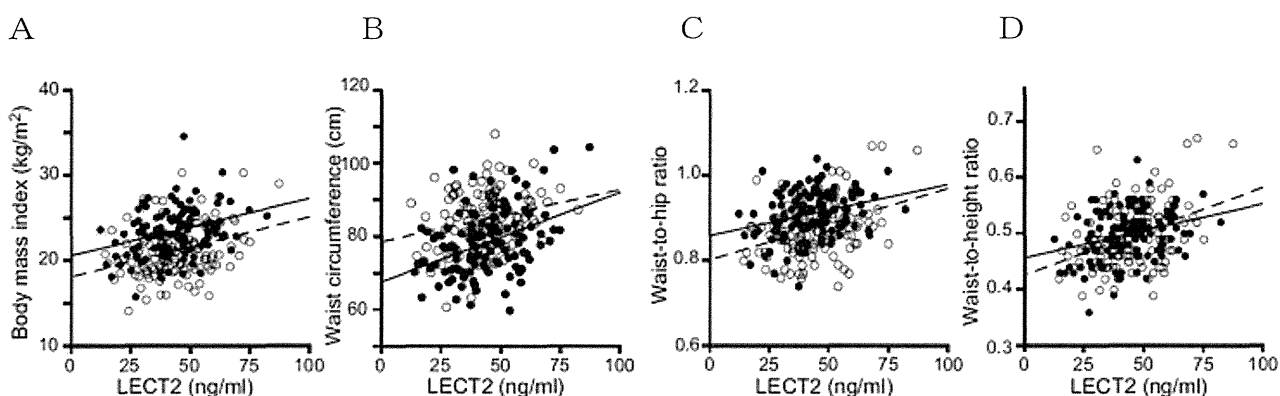


図 1. Relationship between serum LECT2 and anthropometric measurements. Distribution of serum LECT2 concentrations of men (●) and women (○) aged from 40 to 69 by (A) BMI, (B) WC, (C) WHR, and (D) W/Ht.

表 2. Pearson's simple and partial (adjusting for age and gender) correlation coefficients for the association between serum LECT2 and various anthropometric measurements

	BMI	WC	WHR	W/Ht
Total				
Simple correlation	0.297***	0.305***	0.305***	0.341***
Age- and gender-adjusted	0.313***	0.321***	0.324***	0.344***
Men				
Simple correlation	0.290**	0.231*	0.246**	0.256**
Age-adjusted	0.277**	0.223*	0.273**	0.280**
Women				
Simple correlation	0.339***	0.397***	0.368***	0.395***
Age-adjusted	0.356***	0.405***	0.366***	0.395***

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.001$

全体としての相関が一番強く、かつ、肥満・非肥満に分けると約半数ずつになることから、以降、肥満・非肥満の比較を行う際は、全て W/Ht が 0.5 以上の被験者を肥満型、0.5 未満の被験者を痩せ型として解析を行った。これをもとに血清 LECT2 濃度を肥満型・痩せ型で比較すると、肥満型の被験者は 47.4 ± 13.1 ng/ml、痩せ型の被験者は 39.7 ± 13.1 ng/ml であり、有意に肥満型の被験者の血清 LECT2 レベルが高くなっていることがわかった ($P < 0.001$)。

3. 血清 LECT2 レベルと代謝関与因子との相関解析

肥満および肥満関連疾患に関与する各因

子について、Spearman の順位相関係数で血清 LECT2 レベルと有意な相関を示すかを解析した。表 3 に示すように、トリグリセリド、AST、 γ -GTP、尿酸の 4 項目については男女共通して LECT2 濃度を年齢と W/Ht で調整しても血清 LECT2 レベルと有意な相関がみられた。そのほか、C 反応性タンパク、HDL コレステロール、LDL コレステロール、HbA1c、ALT、尿素窒素、血清クレアチニンが、少なくとも男女いずれかで単相関を示すことがわかった。これらに、年齢と W/Ht を加えて、血清 LECT2 濃度を予測する多重回帰分析を行い、独立的に関与している因子の探索を行った。

表3. Spearman's rank correlation coefficients between LECT2 and markers of obesity and secondary complications

	Men (n = 113)				Women (n = 118)			
	Simple correlation		Age- & W/Ht- adjusted		Simple correlation		Age- & W/Ht- adjusted	
	ρ	<i>P</i> value	Partial ρ	<i>P</i> value	ρ	<i>P</i> value	Partial ρ	<i>P</i> value
Age	-0.174	NS	-	-	0.024	NS	-	-
W/Ht	0.239	0.011	-	-	0.352	<0.001	-	-
<i>Inflammation</i>								
hs-CRP	0.262	0.005	0.197	0.040	0.128	NS	0.054	NS
White blood cell	0.029	NS	0.002	NS	0.138	NS	0.102	NS
<i>Hypertension</i>								
SBP	-0.026	NS	-0.072	NS	0.060	NS	-0.005	NS
DBP	0.041	NS	-0.044	NS	0.070	NS	0.032	NS
<i>Dyslipidemia</i>								
Total cholesterol	0.066	NS	0.065	NS	0.071	NS	0.013	NS
Triglyceride	0.307	<0.001	0.261	0.006	0.250	0.006	0.205	0.028
HDL-cholesterol	-0.205	0.030	-0.141	NS	-0.319	<0.001	-0.210	0.025
LDL-cholesterol	0.128	NS	0.105	NS	0.236	0.010	0.137	NS
<i>Diabetes mellitus</i>								
Fasting glucose	0.009	NS	-0.014	NS	0.149	NS	0.090	NS
HbA1c	-0.002	NS	-0.039	NS	0.213	0.021	0.147	NS
<i>Liver disease</i>								
AST	0.207	0.028	0.234	0.014	0.178	NS	0.231	0.015
ALT	0.220	0.019	0.174	NS	0.297	0.001	0.253	0.008
γ -GTP	0.340	<0.001	0.300	0.002	0.261	0.004	0.274	0.004
<i>Kidney disease</i>								
Uric acid	0.278	0.003	0.211	0.028	0.312	<0.001	0.258	0.006
Blood urea nitrogen	0.110	NS	0.137	NS	0.307	<0.001	0.283	0.002
Serum creatinine	0.158	NS	0.180	NS	0.266	0.004	0.242	0.009

単相関解析で、少なくとも男女いずれかで相関を示した項目、W/Ht、トリグリセリド、HDL コレステロール、LDL コレステロール、HbA1c、C反応性タンパク、尿酸、AST、ALT、 γ -GTP、尿素窒素、血性クレアチニンに、年齢を加えて多重回帰分析を行った結果を表4に示す。

男女で分けて解析した結果、男性では γ -GTP、トリグリセリド、年齢が独立した成分として抽出された。一方で、女性では男性と同様に独立因子として γ -GTPが抽出され、さらにW/Ht、尿素窒素、HDL コレステロールが独立した因子として抽出された。

表4. Multiple linear regression analyses with serum LECT2 level as a dependent variable in the subjects

Variable	Unstandardized coefficients			Standardized coefficients β	t	Significance
	B	S.E.	95% CI			
Men (n = 113, R ² = 0.214, adjusted R ² = 0.192, P < 0.001)						
γ -GTP*	15.1	4.5	6.2 to 23.9	0.295	3.363	0.001
TG*	16.3	5.8	4.9 to 27.8	0.248	2.831	0.006
Age	-0.26	0.1	-0.50 to -0.01	-0.178	-2.100	0.038
Women (n = 118, R ² = 0.351, adjusted R ² = 0.328, P < 0.001)						
W/Ht	61.0	20.9	19.6 to 102.4	0.243	2.916	0.004
BUN	1.2	0.3	0.6 to 1.8	0.305	3.976	<0.001
γ -GTP*	16.7	4.7	7.3 to 26.0	0.271	3.521	<0.001
HDL-cholesterol*	-38.3	11.4	-60.9 to -15.7	-0.280	-3.360	0.001

*: log transformed

これらの結果より、いずれの性においても、血清 LECT レベルは脂質異常症および肝疾患への関与が考えられ、女性でのみ腎疾患の影響が考えられた。また、肥満による慢性炎症との関連はC反応性タンパクと単相関では相関があるものの、より強くトリグリセリドや γ -GTPなどと関連していることが判明した。また、血糖およびHbA1cについては女性でHbA1cが単相関のみ有意な相

関が確認できたが、男性や年齢とW/Htで調整した場合には有意な相関はみられなかった。

4. 血清 LECT2 レベルと関連疾患との関連解析

肥満だけでなく、肥満関連疾患として脂肪肝、慢性腎症についてもROC曲線解析

表 5. ROC curve analysis for serum LECT2 as a predictive factor for relative diseases

	AUC (95% CI)	Significance	Cut-off (ng/mL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Men					
Obesity (W/Ht \geq 0.5)	0.655 (0.551-0.758)	0.005	41.8	41.4	62.0
Chronic kidney disease	0.568 (0.379-0.758)	NS	-		
Fatty liver	0.646 (0.545-0.748)	0.007	43.3	67.9	59.7
Women					
Obesity (W/Ht \geq 0.5)	0.670 (0.571-0.769)	0.002	45.0	64.0	72.1
Chronic kidney disease	0.639 (0.465-0.813)	NS	-		
Fatty liver	0.733 (0.623-0.843)	<0.001	46.4	70.4	69.2

を行うことで血清 LECT2 レベルの評価を行った。

その結果、表 5 に示すように慢性腎症については eGFR が 60 ml/min/1.73 m² 未満を慢性腎症とした場合、男女とも血清 LECT2 レベルには予測能があるとは言えなかった。

一方で脂肪肝については、男女とも予測可能であることが判明した。全体を脂肪肝あり、なしで分けると、血清 LECT2 レベルはそれぞれ 48.7 \pm 13.6 ng/ml と 40.5 \pm 12.8 ng/ml となり、有意な差 ($P < 0.001$) が生じていることも明らかとなった。この結果から、男女いずれにおいても、血清

LECT2 レベルは、肥満および脂肪肝の予測能を持つことが明らかとなった。

D. まとめ

ヒトの血清 LECT2 レベルは肥満と正の相関をすることが判明した。また、脂肪肝を呈するとより血清 LECT2 レベルが高くなることも見出した。今回の解析で、血圧や糖尿病に関連する血糖や HbA1c は血清 LECT2 レベルと相関があるとは言えなかった。しかし、この結果より、糖尿病性細小血管障害において、糖尿病そのものでない肥満や

脂質異常症から受ける障害メカニズムに
LECT2 が関与する可能性がある。今後、肥
満および脂肪肝で亢進する LECT2 と糖尿病
性細小血管障害とがどのように関連するか
について探索していく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Akinori Okumura, Takehiro Suzuki,
Hideyuki Miyatake, Tomoya Okabe, Yuki
Hashimoto, Takuya Miyakawa, Hai
Zheng, Hiroyuki Unoki-Kubota, Hideaki
Ohno, Naoshi Dohmae, Yasushi
Kaburagi, Yoshitsugu Miyazaki, Masaru
Tanokura, Satoshi Yamagoe (2013)
"Leukocyte cell-derived chemotaxin 2
is a zinc-binding protein" FEBS
Letters 587(5), 404-409

Eri Takahashi, Akinori Okumura, Hiroyuki
Unoki-Kubota, Hisashi Hirano, Masato
Kasuga, Yasushi Kaburagi (2013)
"Differential proteome analysis of
serum proteins associated with the
development of type 2 diabetes
mellitus in the KK-A^y mouse model using
the iTRAQ technique" Journal of

Proteomics 84C, 40-51

2. 学会発表

Hiroyuki Kubota, Eri Takahashi, Akinori
Okumura, Hisashi Hirano, Yasushi
Kaburagi "Identification of
differential proteomes associated
with the development of type 2 diabetes
in the KK-A^y mice using iTRAQ
technique" 9th International Diabetes
Federation Western Pacific Region
Congress (9th IDF-WPR Congress) and
4th Scientific Meeting of the Asian
Association for the Study of Diabetes
(4th AASD Scientific Meeting), Kyoto,
Japan, November 27, 2012, 口頭発表

奥村彰規、佐藤恵美、久保田浩之、鏑木康
志 "糖尿病性網膜症の発病プロセスに関
与する血中タンパク質" 第 55 回日本糖
尿病学会年次学術集会、パシフィコ横
浜・パン パシフィック 横浜ベイホテル
東急 (横浜)、2012 年 5 月 18 日、口頭発
表

鏑木康志、佐藤恵美、本間綾香、加納圭子、
高橋枝里、奥村彰規、中村直子、佐伯久
美子、湯尾明、平野久、久保田浩之 "糖
尿病性細小血管症バイオマーカー探索の
試み" 第 55 回日本糖尿病学会年次学術
集会、パシフィコ横浜・パン パシフィッ

ク 横浜ベイホテル東急 (横浜)、2012 年 5 月 18 日、口頭発表

こめっせ (京都)、2012 年 4 月 13 日、ポスター発表

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-A γ 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、パシフィコ横浜・パン パシフィック 横浜ベイホテル東急(横浜)、2012 年 5 月 18 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、鏑木康志 「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

佐藤恵美、加納圭子、本間綾香、高橋枝里、奥村彰規、久保田浩之、鏑木康志 “尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索” 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、パシフィコ横浜・パン パシフィック 横浜ベイホテル東急 (横浜)、2012 年 5 月 19 日、ポスター発表

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

奥村彰規、佐藤恵美、久保田浩之、鏑木康志 “糖尿病性網膜症の発症プロセスに関する血中タンパク質の機能解析” 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会、みやこめっせ (京都)、2012 年 4 月 13 日、ポスター発表

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-A γ 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、みや

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

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

分担研究者 鏑木康志

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】糖尿病腎症の早期発見は糖尿病腎症による腎不全への進展防止のために重要である。今回我々は、糖尿病腎症の早期尿中関連因子を探索することを目的に、健常者および糖尿病腎症患者尿検体を用いたプロテオーム解析を行った。【方法】健常者(H)8名、2型糖尿病患者(腎症病期1期:DN-)16名、糖尿病腎症患者(腎症病期2期:DN+)16名より採取した尿検体(約5ml)よりアルブミン/IgG抗体カラムを用いてアルブミンならびにIgGを除去後、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)を行った。H vs DN-, H vs DN+, DN- vs DN+の比較にて有意に発現変動する蛋白質スポットを切り出し酵素消化した後、エレクトロスプレーイオン源を装備したLCQ-DECA XP Plus(Thermo Electron)にてLC-MS/MS解析を行った。同定された蛋白質群について独立した検証用検体(H:14名、DN-:13名、DN+:15名、糖尿病腎症病期3期(DN3):16名))を用いてmultiple reaction monitoring(MRM)法により尿中蛋白質発現量を一斉定量解析した。【結果】2D-DIGE法によるディファレンシャル解析の結果、H vs DN-, H vs DN+, DN- vs DN+の比較で有意に変動する蛋白質スポットがそれぞれ67個、312個、123個認められた。LC-MS/MS解析の結果、H vs DN-, H vs DN+, DN- vs DN+の比較にて有意に発現上昇する蛋白質が24種、有意に発現減少する蛋白質が8種同定された。32蛋白質のうちMRM transitionが設定可能であった30蛋白質(発現上昇蛋白質:23, 発現減少蛋白質:7)を対象に検証用検体を用いて尿中蛋白質発現量をMRM法にて測定した。H, DN-, DN+群間での有意な

発現変動が認められた25蛋白質のうち2D-DIGE解析と同様の発現変動が検証された蛋白質は19種だった。これらの結果にDN3患者における25蛋白質の尿中蛋白質発現量測定データを追加し重回帰分析を行った結果、尿中アルブミン・クレアチニン比にafamin (β : 0.443, $p < 0.001$)、antithrombin III (β : 0.286, $p < 0.001$)、ceruloplasmin (β : 0.224, $p < 0.002$)の3蛋白質が関連していた。早期腎症以降への進展を基準評価としたreceiver operative characteristics (ROC) 曲線を用いた検討では、3蛋白質のROC曲線下面積はいずれも0.8以上の高い判別能を示した。また、afaminのカットオフ値を3.3とすると感度、特異度は92.3%、78.1%、antithrombin IIIのカットオフ値を2.0とすると感度、特異度は82.8%、75.9%、ceruloplasminのカットオフ値を3.1とすると感度、特異度は89.3%、80.0%であった。【結論】今回同定された3種の尿蛋白質は糖尿病腎症の発症・進展に関する新たな診断マーカーとなる可能性がある。

A. 研究目的

近年、糖尿病腎症から腎不全となって透析導入となる患者は増加傾向にあり、透析導入の原因疾患の中で45%と第一位を占めている。糖尿病腎症の治療においては、腎機能障害の軽度の段階で治療を開始しなければ、腎機能不全が治療の有無に関わらず進行するが、自覚症状が全くないために治療可能な時期を逸することが多い。糖尿病腎症の診断には尿検査が重要であるが、一般的な尿検査で蛋白尿が出た時には腎機能障害が既に進行しており、完治することは不可能である。最近、尿中の微量アルブミンを測定して、初期腎症を診断する検査が

行われるようになったが、現時点では糖尿病腎症による腎不全を減少させるまでは至っていない。また、微量アルブミン尿は動脈硬化性疾患との関連性が指摘されており、糖尿病腎症の特異的なマーカーであるかは明らかではない (Deckert et al. Diabetes Care (1992) 15, 1181-1191)。糖尿病腎症の微量アルブミン以外の尿マーカーとしては、IV型コラーゲンが既に臨床の現場で使われ出しているが、腎症の早期診断マーカーとしての意義は未だ十分には確立していない。

近年、質量分析計等の分析機器の進歩によって、生体試料のような多種類の蛋白質

の混合物であるサンプルから微量蛋白質を検出して同定することが可能となった。このプロテオーム解析の技術を用いて様々な疾患の患者から採取した血清、組織等の臨床検体を試料として、その中に含まれる蛋白質を網羅的に同定することによって、疾患の病態の変動、治療に対する反応などの指標となるバイオマーカーの探索が盛んに行われている。ところが、尿は採取が非常に容易なものの、塩濃度が高く蛋白濃度が低いこと、様々な塩以外の不純物を含むことから、プロテオーム解析は困難であり、実際に糖尿病腎症に関する過去の報告でも、二次元電気泳動 (Sharma et al. Proteomics (2005) 5, 2648-2655; Rao et al. Diabetes Care (2007) 30, 629-637)、 SELDI-TOF (Dihazi et al. Clin Chem (2007) 53,

1645-1653) を用いた少数の蛋白質の検出・同定しか行われていない。

我々はこれまでに、尿蛋白質の限外濾過による濃縮と尿中アルブミン等の多量蛋白質除去を組み合わせた前処理を行ったサンプルを蛍光標識二次元ディフュージョンゲル電気泳動 (2D-DIGE) 及び質量分析機で分析すると、2000種前後の蛋白質を比較解析することが可能となる系を確立している。この解析系を用いて、現時点で早期腎症として診断可能な微量アルブミン尿を有する病期2期より早い段階の尿中蛋白質を多角的な視野から網羅的に解析することによって、微量アルブミン量より有用な糖尿病腎症の早期マーカーを探索することを試みた。

表1. 解析に用いた2型糖尿病患者及び健常者対照群の臨床像

	Healthy control subjects (H)	Diabetics without microalbuminuria (DN-)	Diabetics with microalbuminuria (DN+)
Number	8	16	16
Age	57.50 ± 2.67	57.88 ± 3.52	58.06 ± 7.29
Male: Female	1:1	1:1	1:1
BMI	21.81 ± 2.94	24.91 ± 3.38	25.47 ± 3.86
Duration of diabetes (years)	—	10.25 ± 6.94	9.25 ± 7.33
Systolic Blood Pressure (mmHg)	126.5 ± 6.4	129.1 ± 9.9	131.8 ± 14.2
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	78.9 ± 9.2	77.6 ± 9.3	76.6 ± 12.9
Estimated GFR (MDRD-4)	103.88 ± 24.52	89.13 ± 18.09	86.10 ± 24.76
Urine albumin (mg/g Cr)	8.51 ± 3.68	11.77 ± 5.37	61.05 ± 33.96
HbA _{1c} (%)	—	7.44 ± 1.37	7.43 ± 1.02

B. 研究方法

1. 2D-DIGE解析

健常者(H)8名、2型糖尿病患者(腎症病期1期:DN-)16名、糖尿病腎症患者(腎症病期2期:DN+)16名から随時尿を採取した(表1)。微量アルブミン尿の判定は尿アルブミン/クレアチニン比20mg/g Crを閾値として判定した。採取した尿を限外ろ過にて濃縮し、Albumin and IgG Removal Kit (GE)にてアルブミン、IgGを除去後のサンプルをCyDyeにてラベルし、尿蛋白質プロファイルを2D-DIGE法にて解析した。ゲルイメージの解析はDeCyderにより行い、各群間で有意に変化したスポットを切り出した。切り出したスポットからトリプシン消化後にペプチドを抽出しエレクトロスプレーイオン源を装備したLCQ-DECA XP Plus(Thermo Electron)にてLC-MS/MS解析を行った。得られたMS/MSスペクトルデータをMASCOTにてデータベース検索し、蛋白質を同定した。

2. Multiple reaction monitoring (MRM)定量解析

2D-DIGE解析とは独立した患者群(H 14名、DN- 13名、DN+ 15名、糖尿病腎症病期3期(DN3)患者 16名)から採取した尿検体58サンプルを用い、2D-DIGE解析にて同定された蛋白質を対象にMRM法にて定量解析を行った。MRM transitionの設定は、

2D-DIGE解析にて得られたMSデータに基づきMRM Pilotソフトウェアにて行った。標的ペプチド配列が設定MRM transitionにより同定されているかの確認はenhanced product ion (EPI)-MS/MSにより行った。EPI-MS/MSにて標的ペプチド配列が同定できない場合には合成ペプチドを用いたLC-MRMを行い、分析用試料とMRM取得ピーク、溶出時間が一致することを確認した。

尿検体はAlbumin and IgG Removal Kitにてアルブミン、IgGを除去し、蛋白質変性、システイン残基の還元アルキル化後にトリプシンにて酵素消化した。酵素消化産物に内部標準ペプチドとして安定同位体元素標識ペプチド10 fmolを添加した。MRM解析は、nanoLCを接続した5500QTrap (ABSciex)システムにて行った。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、相対タンパク質濃度を算出した。

3. 統計解析

各測定値は平均値±標準偏差で示した。多群間の有意差検定はKruskal-Wallis検定にて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。重回帰分析、ロジスティック回帰分析、receiver-operating characteristic (ROC) 解析はIBM SPSS statistics 20ソフトウェアにて行った。

表 2. H 群と比べて DN+群にて有意に増加した尿蛋白質

Spot No.	Protein Name	Accession No.	MW	pI	Fold			Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score
					DN+ vs H	DN+ vs DN-	DN- vs H			
107, 136, 147, 197, & 203	Ceruloplasmin precursor	CERU_HUMAN	122983	5.44	1.91	1.67		12	12%	229
					2.83	1.91		15	15%	315
					3.68	1.9		16	14%	333
					2	1.65		5	4%	75
					2.11	1.63		7	7%	108
114, & 519	Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	109870	5.31	2.07	1.8		11	12%	196
					2.45			10	9%	176
190, 448, 494, 538, 547, 549, 581, 587, & 617	Lysosomal alpha-glucosidase precursor afamin precursor	LYAG_HUMAN	106126	5.62	1.9	1.58		13	11%	237
					4.12			18	29%	297
586, & 594	Alpha-1B-glycoprotein precursor	A1BG_HUMAN	54809	5.58	6.02	2.51	2.4	19	24%	456
					5.77	2.9		30	40%	647
632, 633, 693, 799, 826, 835, 846, 868, 893, 910, & 1042	Serotransferrin precursor	TRFE_HUMAN	79280	6.81		2.16		11	13%	161
					4.28			7	9%	141
817, 849, & 869	Alpha-1-antitrypsin precursor	A1AT_HUMAN	46878	5.37	6.77	3.09		60	54%	893
					3.9	1.99		4	6%	154
1138, 1156	Alpha-1B-glycoprotein precursor	A1BG_HUMAN	54809	5.58	2.52	2.27		13	27%	239
					2.95			16	25%	205
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Glutamyl aminopeptidase	AMPE_HUMAN	109717	5.62	3.63	2.23		9	16%	149
					3.25		2.45	12	11%	173
1136, 1174, & 1286	Serum albumin precursor	ALBU_HUMAN	71317	5.92	3.43			8	8%	124
					4.19			5	8%	122
1138, 1156	Alpha-1-antitrypsin precursor	A1AT_HUMAN	46878	5.37	2.71			13	25%	264
					3.98	3		24	45%	288
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Alpha-1-antitrypsin precursor	A1AT_HUMAN	46878	5.37	1.73	1.71		4	7%	124
					4.91	3.48		24	43%	297
1138, 1156	Alpha-1-antitrypsin precursor	A1AT_HUMAN	46878	5.37	4.53			28	46%	326
					3.45			14	32%	231
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Alpha-1-antitrypsin precursor	A1AT_HUMAN	46878	5.37	2.79			7	21%	184
					2.32			12	27%	265
1138, 1156	Thyroxine-binding globulin precursor	THBG_HUMAN	46637	5.87	1.96			20	35%	414
					2.05			19	28%	417
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Antithrombin-III precursor	ANT3_HUMAN	53025	6.32	3.16			15	30%	365
					3.22			34	42%	545
1136, 1174, & 1286	Arylsulfatase A precursor	ARSA_HUMAN	54409	5.65			1.96	7	13%	191
					2.5			9	18%	151
1136, 1174, & 1286	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	A2GL_HUMAN	38382	6.45	3.43			9	19%	73
					3.82			11	22%	141
1138, 1156	Plasma alpha-L-fucosidase precursor	FUCO2_HUMAN	54368	5.78	2.78			8	16%	67
					3.14			6	12%	128
1138, 1156	N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor	GNS_HUMAN	62840	8.6	2.81			5	9%	117
					3.19			2	8%	99
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	3.82			5	18%	181
					2.78			5	19%	119
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	2.95			8	25%	209
					3.45			13	37%	173
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	3.2			12	41%	226
					2.24			2	8%	63
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	4.81			13	38%	175
					3.75			4	17%	90
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	4.13			26	46%	326
					2.95			8	21%	143
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Di-N-acetylchitobiase precursor	DIAC_HUMAN	44416	6.19	3.69			15	26%	201
					5.87			7	18%	157
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Haptoglobin precursor	HPT_HUMAN	45861	6.13				7	18%	157
					1.81	1.83		12	24%	219
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Serpine B13	SPB13_HUMAN	44305	5.48	2.7		1.93	2	7%	113
					2.11			12	25%	243
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Cathepsin Z precursor	CATZ_HUMAN	34530	6.7	2.11			12	25%	243
					1.8			5	8%	119
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Lysosomal protective protein precursor	PPGB_HUMAN	54944	4.89	1.71			10	17%	120
					1.71			10	17%	120
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Beta-hexosaminidase beta chain precursor	HEXB_HUMAN	63527	6.29	2.14			6	20%	56
					2.14			6	20%	56
1198, 1207, 1250, 1343, 1400, 1445, 1481, 1573, 1585, & 3030	Ganglioside GM2 activator precursor	SAP3_HUMAN	21281	5.17	2.14			6	20%	56
					2.14			6	20%	56

a) Protein identity was given as precursor form.

b) Protein group

表 3. H 群と比べて DN+群にて有意に減少した尿蛋白質

Spot No.	Protein Name ^{a)}	Accession No.	MW	pI	Fold	Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score	Reference
107,	Ceruloplasmin [precursor]	CERU_HUMAN	122983	5.44	1.67	7	8%	214	7, 21, 22
136,					1.91	12	12%	303	
147,					1.9	13	12%	316	
197,					1.65	3	3%	69	
& 203					1.63	4	4%	107	
114,	Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	109870	5.31	1.8	6	7%	185	23, 24
190	Lysosomal alpha-glucosidase [precursor]	LYAG_HUMAN	106126	5.62	1.58	9	9%	237	25
494,	Serotransferrin [precursor]	TRFE_HUMAN	79280	6.81	2.51	19	24%	456	7, 21, 22
538,					2.9	26	36%	647	
549,					2.16	4	6%	139	
587,					3.09	38	40%	863	
& 617					1.99	3	5%	154	
543,	Alpha-1B-glycoprotein [precursor]	A1BG_HUMAN	54809	5.58	2.27	9	20%	239	15
& 594				2.23	6	12%	142		
826,	Alpha-1-antitrypsin [precursor]	A1AT_HUMAN	46878	5.37	3	10	27%	275	15, 19, 32, 33
835,					1.71	4	7%	124	
846,					3.48	9	24%	293	
331	Homerin	HORN_HUMAN	283140	10.05	-1.71	4	2%	124	
342,	Polymeric immunoglobulin receptor [precursor]	PIGR_HUMAN	84429	5.58	-1.57	10	15%	325	
379,					-1.58	10	13%	269	
388,					-1.62	12	16%	301	
& 397					-1.63	11	14%	286	
1637					Deoxyribonuclease-1 [precursor]	DNAS1_HUMAN	31642	4.71	

a) Protein identity was given as precursor form.

b) Protein group

表 4. DN-群と比べて DN+群にて有意に変動した尿蛋白質

Spot No.	Protein Name ^{a)}	Accession No.	MW	pI	Fold	Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score	Reference
107,	Ceruloplasmin [precursor]	CERU_HUMAN	122983	5.44	1.67	7	8%	214	7, 21, 22
136,					1.91	12	12%	303	
147,					1.9	13	12%	316	
197,					1.65	3	3%	69	
& 203					1.63	4	4%	107	
114,	Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	109870	5.31	1.8	6	7%	185	23, 24
190	Lysosomal alpha-glucosidase [precursor]	LYAG_HUMAN	106126	5.62	1.58	9	9%	237	25
494,	Serotransferrin [precursor]	TRFE_HUMAN	79280	6.81	2.51	19	24%	456	7, 21, 22
538,					2.9	26	36%	647	
549,					2.16	4	6%	139	
587,					3.09	38	40%	863	
& 617					1.99	3	5%	154	
543,	Alpha-1B-glycoprotein [precursor]	A1BG_HUMAN	54809	5.58	2.27	9	20%	239	15
& 594				2.23	6	12%	142		
826,	Alpha-1-antitrypsin [precursor]	A1AT_HUMAN	46878	5.37	3	10	27%	275	15, 19, 32, 33
835,					1.71	4	7%	124	
846,					3.48	9	24%	293	
331	Homerin	HORN_HUMAN	283140	10.05	-1.71	4	2%	124	
342,	Polymeric immunoglobulin receptor [precursor]	PIGR_HUMAN	84429	5.58	-1.57	10	15%	325	
379,					-1.58	10	13%	269	
388,					-1.62	12	16%	301	
& 397					-1.63	11	14%	286	
1637					Deoxyribonuclease-1 [precursor]	DNAS1_HUMAN	31642	4.71	

a) Protein identity was given as precursor form.

b) Protein group

表 5. H 群と比べて DN-群にて有意に変動した尿蛋白質

Spot No.	Protein Name ^{a)}	Accession No.	MW	pI	Fold	Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score	Reference
494,	Serotransferrin [precursor]	TRFE_HUMAN	79280	6.81	2.4	19	24%	456	7, 21, 22
547,					2.39	6	9%	158	
632	Glutaryl aminopeptidase	AMPE_HUMAN	109717	5.62	2.45	8	7%	166	26, 27
904	Arylsulfatase A [precursor]	ARSA_HUMAN	54409	5.65	1.96	7	13%	191	
1437	Serp1n B13	SPB13_HUMAN	44305	5.48	1.83	7	20%	219	
1827	Cathepsin Z [precursor]	CATZ_HUMAN	34530	6.7	1.93	2	7%	113	29
707	Hemopexin [precursor]	HMO_HUMAN	52385	6.55	-2.55	4	11%	123	15

a) Protein identity was given as precursor form.

蛋白質中30蛋白質(発現上昇蛋白質:23, 発現減少蛋白質:7)がMRM定量解析可能であった。H 17名、DN- 13名、DN+ 15名の尿検体を用いて相対定量解析を行った結果、25蛋白質がH, DN-, DN+群間で有意な発現変動を示した。このうち2D-DIGE解析と同様の発現変動が検証された蛋白質は19種(発現上昇蛋白質:14, 発現減少蛋白質:5)だった。

糖尿病腎症の早期尿中関連因子を絞り込む目的で、DN3患者16名における30蛋白質の尿中蛋白質濃度を追加測定し先のデータと併せて重回帰分析を行った。解析の結果、尿中アルブミン・クレアチニン比にafamin (β :0.443, $p<0.001$)、antithrombin III (β :0.286, $p<0.001$)、ceruloplasmin (β :0.224, $p=0.002$)の3タンパク質が関連することが示された。これら3タンパク質に加えて性別、糖尿病罹病期間、BMI、収縮期血圧、トリグリセリド、空腹時血糖、HbA1c、eGFRを説

明変数とした多重ロジスティック回帰分析を行った。早期腎症以降への進展に及ぼす因子としてeGFR (オッズ比:0.968; 95% CI:0.941-0.995; $p=0.019$)、afamin (オッズ比:2.808, 95% CI:1.223-6.447, $p=0.015$)が選択された。早期腎症以降への進展を基準評価としたROC解析では、afamin, antithrombin III, ceruloplasminのROC曲線下面積(AUC)はそれぞれ0.940, 0.836, 0.903であり、いずれの蛋白質もeGFR (AUC:0.745)に比べて高い診断能を示した。なお、afamin, antithrombin III, ceruloplasminのそれぞれのカットオフ値に対する感度、特異度は、eGFRのカットオフ値を76.8とした場合の感度、特異度に比べていずれも高値を示した(表6)。

D. 考察

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

Table 6. Diagnostic discrimination between diabetic nephropathy patients (DN+ and DN3) and non-diabetic nephropathy subjects (H and DN-).

Protein description	Cutoff value	Sensitivity, %	Specificity, %	AUC, %
Afamin	3.3	92.3	78.1	94.0
Antithrombin III	2.0	82.8	75.9	83.6
Ceruloplasmin	3.1	89.3	80.0	90.3
eGFR	76.8	77.8	67.7	74.5

患の診断及び治療にいかにかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者 710 万人、潜在的には推計 2210 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質を検索することは、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 2 型糖尿病患者由来尿の解析によって、2 型糖尿病及び糖尿病腎症によって有意に変動する蛋白質を多数同定することができた。また、尿中アルブミン・クレアチニン比に関連する 3 蛋白質は、本研究における解析集団の早期腎症以降への進展を eGFR よりも高い精度で判別した。今回同定された 3 種の蛋白質と糖尿病腎症の発症・進展との関連をより大規模な集団にて検証することや慢性腎不全との関連の検討などが今後の課題として挙げられるものの、これらの尿蛋白質は糖尿病腎症の発症・進展をより早期に検出する診断・予測マーカーとして新たな糖尿病腎症の予防・治療先約の構築に貢献する可能性がある。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究発表

論文：

該当事項なし

学会発表：

鏑木康志、佐藤恵美、本間綾香、加納圭子、高橋枝里、奥村彰規、中村直子、佐伯久美子、湯尾明、平野久、久保田浩之。糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会。2012/5/17-19、横浜(2012)。

鏑木康志、山下 亮、本間綾香、佐藤（三城）恵美、久保田浩之。尿プロテオーム解析による糖尿病腎症関連因子の探索。第 27 回日本糖尿病合併症学会。2012/11/2-3、福岡(2012)。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

出願準備中

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし