

201223005A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）

糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる
新規バイオマーカーの同定

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）

糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる
新規バイオマーカーの同定

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 平成24年度構成員名簿	-----	2
II. 総括研究報告		
糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの同定		
和田淳	-----	3
III. 分担研究報告		
1. 血液サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討		
江口潤	-----	9
2. 尿サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討		
中司敦子	-----	14
3. レクチンアレイ解析による新規バイオマーカーの同定		
肥田和之	-----	18
4. レクチンカラムによる糖タンパク質の精製		
利根淳仁	-----	22
5. 質量解析による新規バイオマーカーの同定		
伊勢田泉	-----	25
6. 新規尿中バイオマーカー同定のための糖尿病患者コホート研究		
槇野博史	-----	28
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	32

I. 平成24年度構成員名簿

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	和田 淳	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学	准教授
研究分担者	槇野博史	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学	教授
	江口 潤	岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科	助教
	中司敦子	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖尿病性腎症治療学講座	助教
	肥田和之	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター 糖尿病・代謝内科	医長
	利根淳仁	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター 糖尿病・代謝内科	常勤医
	伊勢田泉	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター 糖尿病・代謝内科	常勤医
研究協力者	四方賢一	岡山大学病院・新医療研究開発センター	教授
	小川大輔	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖尿病性腎症治療学講座	准教授
	内田治仁	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学	助教
	井上謙太郎	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学	研修登録医
	中塔辰明	岡山済生会総合病院・糖尿病センター	センター長
	松岡 孝	倉敷中央病院・糖尿病内科	主任部長
	清水一紀	心臓病センター榑原病院・糖尿病内科	内科部長
	松下裕一	津山中央病院	副部長
	宮下雄博	岡山赤十字病院・総合内科	健診部長
	羽井佐茂	岡山市立市民病院・糖尿病センター	センター長
	安藤晋一郎	岡山市立市民病院・糖尿病センター	副センター長
	永瀬亮	岡山労災病院・糖尿病センター	センター長

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）
総括研究報告書

糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの同定

研究代表者 和田 淳

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 准教授

研究要旨

ヒトゲノムの配列が決定され、ポストゲノム研究が注目を集めるなか、糖尿病および糖尿病合併症の発症や進展に糖鎖異常が関与していることが報告されている。これらの糖鎖異常が明らかになれば、予後推測するバイオマーカーとして有用であるのみならず、その糖鎖異常をターゲットとした治療戦略へと研究が展開する可能性がある。そこで糖尿病性腎症患者の血清及び尿の糖鎖プロファイルを一網打尽的に解析した。健常人と糖尿病性腎症患者の血清サンプル及びセントリコンにより濃縮した尿サンプルをAgilentマルチプルアフィニティ除去システムで6種の主要蛋白を除去した後、透析膜を用いてPBSにバッファー交換した。Glycostation(GPバイオサイエンス)を用いて45種のレクチンへの結合を同時に検出できるレクチンアレイを施行し、GlycoStationToolsにより各種糖鎖構造の定量を行った。健常人と糖尿病性腎症の各病期で糖鎖プロファイルを検討することにより、糖尿病性腎症に特徴的な糖鎖異常が存在するかどうかを検討した。血清サンプルの糖鎖プロファイリングでは健常人と糖尿病患者で大きな違いは認められなかった。次に健常人(n=12)、糖尿病性腎症(n=17:1期7名、2期5名、3期3名、4期2名)の尿サンプルを用いて、糖尿病性腎症の病期別にレクチンアレイ解析を行った。蛋白質濃度を測定し、Cy3標識したサンプルを濃度調製しGlycostationにより45種のレクチンへの結合性を測定した。腎症病期の進行にしたがって、シグナルが上昇していたのは α 2-6結合シアル酸関連レクチン(SNA,SSA,TJA-1)であったが、その上昇は3期以降であった。またN型糖鎖関連レクチン (PHAL,RCA120,PHAE,DSA)が2期で上昇した。その他のレクチンに関してはその結合性が進行性に低下していた。次に患者尿サンプルで病期に従ってシグナルが上昇する傾向がみられたSSAカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーを施行した。得られたサンプルをLC-MS/MSによるショットガン解析を施行したところ、Fetuin-A、Orosomucoidなど28種類の糖蛋白質を同定した。今回同定した糖鎖プロファイリングにより α 2-6結合シアル酸関連レクチンへの結合性が病期の進行に伴って上昇することが示された。このたび同定された糖蛋白質のうち8種類はELISA法で測定が可能であり、糖尿病性腎症の新たなバイオマーカーの候補として、平成24年度より開始した725症例の前向きコホート研究においてその意義を検討している。

研究分担者

榎野博史（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・腎・免疫・内分泌代謝内科学・教授）、江口潤（岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教）、中司敦子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・助教）、肥田和之（独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・医長）、利根淳仁（国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・常勤医）、伊勢田泉（国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・常勤医）

A. 研究目的

生体内の蛋白質は酵素的に糖鎖修飾を受け、その機能に多大なる影響を与えており、その重要性は従来から認識されていた。しかしそ

れらの糖鎖修飾は、当該蛋白をコードする遺伝子とは別の糖鎖修飾酵素群によって制御されていること、またその糖鎖構造の解析は、核酸やペプチドと比較して困難であったことより、その解析は未だ十分に行われているとは言いがたい。近年、糖尿病や糖尿病合併症の進展においても、糖鎖異常が関連しているという報告が多くなされている。1991年、高血糖条件下においてヘキソサミン代謝経路が活性化されUDP-N-acetylglucosamineの生産が増加し、核内および細胞質内の糖タンパク質であるO-GlcNAcレベルを増加させるという報告がされた(*JBC* 266:4706-4712, 1991)。その後、動物においてヘキソサミン経路の活性化により、インスリン抵抗性が出現することや(*Diabetes* 53:921-930, 2004)、糖尿病腎症発症におけるマトリックス蛋白生合成に関与してい

る TGF- β の転写活性が亢進すること (*JCI* 101:160-169, 1998)、また糖尿病性腎症でみられる細胞周期の停止によるメサンギウム細胞の肥大化を誘導することもわかった (*Biochemical J* 388:537-544, 2005)。

我々は β -galactoside 構造を認識し結合するガレクチンファミリーのひとつである galectin-9 を発見し (*JBC* 28:6078-6086, 1997)、胸腺細胞や活性化 T 細胞にアポトーシスを誘導すること (*JCI* 99:2452-2461, 1997)、galectin-9 は糖尿病性腎症に認められる G1 期細胞周期停止を解除して腎症に対して治療効果を発揮することを見出した (*J Am Soc Nephrol* 16:3222-3242, 2005)。さらに最近 galectin-9 が T cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) のリガンドとして作用して T_{H1} 細胞にアポトーシスを誘導することによって1型糖尿病マウス(NODマウス)に治療効果を発揮することを見出した (*Endocrinology* 153(2), 612-620, 2012)。これらの発表は、糖尿病や糖尿病性腎症の成因の一つとして、糖鎖の変化が関連していることを示している。

しかし、糖鎖の特徴として構造が複雑であり糖鎖構造を同定するためには大変な労力が必要であり、多くの症例を検討することは困難であった。GP バイオサイエンスの開発したレクチンアレイにより、糖と結合する蛋白であるレクチンを用いて被験糖鎖とそれぞれに特異性の異なる 45 種類のレクチンとの結合性が同時に検出可能となった (*Nature Methods* 2:851-856, 2005)。更にすべてのレクチンの詳細な特異性の情報を格納したデータベースの確立によりパターン認識による糖鎖構造推定が可能となったため、多くの検体について糖鎖を検討することが可能となった。

本研究においては平成24年度に糖尿病性腎症の尿のレクチンアレイ解析を第1期から4期にわたって施行することにより腎症の進行に特異的な糖鎖プロファイルを同定する。平成25年度は特異的な糖鎖に対応するレクチンをもちいたアフィニティークロマトグラフィーと質量解析(LC-MS/MS)を施行して、腎症の進行を予測するマーカーを同定する。平成26年度の最終年度には3年間ストックした尿検体を用いて、バイオマーカーのELISA測定を行い、腎症の進展を予測するバイオマーカーを同定する。

B. 研究方法

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。血清10

μ Lをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができる。

尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 μ Lをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができる。

健常者、糖尿病性腎症1期、2期、3期、4期患者尿の糖鎖プロファイリングをレクチンアレイを用いて検討したところ、 α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。そこでSSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで α 2-6シアル酸関連レクチンに結合する糖タンパク質を精製した。さらに質量解析によってこれらの糖タンパク質の同定を行った。

糖尿病患者のコホート研究を行うことにより、糖尿病性腎症の病期の進展や腎機能低下や末期腎不全への移行を予測し、尿中微量アルブミンを凌駕する新規尿中バイオマーカーを同定することとした。岡山大学病院および岡山県内の7病院で、糖尿病患者の血清・尿・ゲノムDNAを平成24-26年度にわたって1年間に一度血清と尿の検体を保存する。

倫理面への配慮

本研究に参加される患者には、検体の採取 (採血) に伴う肉体的苦痛とその対処法について説明し、文書による承諾書を得た。個人情報については連結可能匿名化を行った後、臨床データについては各々の施設で管理し、尿レクチンアレイや尿バイオマーカー・遺伝子多型情報は岡山大学で管理する。従ってそれぞれの機関から同時に情報が漏洩しない限り、個人と臨床データ・遺伝子多型を特定できない。送付されてきた検体および診療情報等は連結しにくくするためにさらに二重匿名化を行なう。また、情報は非ネット下にて解析し複数 (最低3重) の施設下で管理し、指紋認証およびパスワード入力が必要

な専用のコンピューターを使用し、複写禁止ソフトをインストールしてプリンター(紙媒体)やUSBなどの媒体に情報を移せないようにした上で関係者のみが情報解析を行う。なお本研究は岡山大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認され、さらに7病院の倫理委員会においても承認されている。

C. 研究結果

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStation™, LecChip™) による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。血清10 µLをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルの検出に成功し、さらに健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

次に尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStation™, LecChip™) による測定を行うための尿前処置の方法について検討した。尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 µLをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症患者尿サンプルの糖鎖プロファイルを健常者と比較したところ、疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた。

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStation™, LecChip™) を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症1期(n=7)、2期(n=5)、3期(n=3)、4期(n=2)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展とともにシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められ

た。 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。

そこでSSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで α 2-6シアル酸関連レクチンに結合する糖タンパク質を精製した。このタンパク質をSDS-PAGEに展開したところ、 α 2-6シアル酸を認識するSSAカラムで精製された複数の糖タンパク質が、糖尿病性腎症の進行に伴って増加しており、病期による変化が認められた。さらに質量解析によってこれらの糖タンパク質の同定を行った。糖尿病性腎症の新規バイオマーカーとしては、Alpha-2-macroglobulin, Apolipoprotein A-I, Protein AMBP (alpha-1-microglobulin), Hemopexin, Ceruloplasmin, Alpha-1B-glycoprotein, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Alpha-1-acid glycoprotein 1 (orosomucoid), Vitamin D-binding protein, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A), Angiotensinogen, Kininogen-1が得られ、これらは糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーであることが想定される。

糖尿病患者のコホート研究を行うことにより、糖尿病性腎症の病期の進展や腎機能低下や末期腎不全への移行を予測し、尿中微量アルブミンを凌駕する新規尿中バイオマーカーを同定することとした。岡山大学病院および岡山県内の7病院で、糖尿病患者の血清・尿・ゲノムDNAを平成24-26年度にわたって1年間に一度血清と尿の検体を保存する。725例の症例組み入れがあり、糖尿病性腎症の進展を予測する上で尿中微量アルブミンを凌駕するような新規尿中バイオマーカーを同定する上で、十分な症例数を有するコホート研究が開始できた。

D. 考察

血清のレクチンアレイを施行する際には血清中に多量に存在する主要タンパクを除去し、さらにその溶出バッファーからPBSへのバッファー交換が必要であることが判明した。バッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイは、尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮することによって、後は血清と同様の処理によって測定が可能であることが判明した。尿サンプル

の検討では、疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた。すなわちフコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンのシグナルは病期の進行に伴い低下し、 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。またN型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し特徴的な経過を示した。

次にSSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、糖タンパク質を精製したところ、複数の糖タンパク質が病期の進展に従って増加していることが判明した。さらに質量解析の結果、糖尿病性腎症の新規バイオマーカーとしては、Alpha-2-macroglobulin, Apolipoprotein A-I, Protein AMBP (alpha-1-microglobulin), Hemopexin, Ceruloplasmin, Alpha-1B-glycoprotein, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Alpha-1-acid glycoprotein 1 (orosomucoid), Vitamin D-binding protein, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A), Angiotensinogen, Kininogen-1が、その候補として今後検討すべきであると考えられる。

なおコホート研究においては725例の症例組み入れがあり、糖尿病性腎症の進展を予測する上で尿中微量アルブミンを凌駕するような新規尿中バイオマーカーを同定する上で、十分な症例数を有するコホート研究が開始できた。平成24-26年度にわたって新規尿中バイオマーカーを測定しその有用性を検証する予定である。

E. 結論

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルにおいては、血清サンプルより尿サンプルの解析の方が、糖尿病性腎症における疾患特異的な変化が見出される可能性が高い。さらにレクチンアレイの結果に基づいた、レクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質の同定は、尿中新規バイオマーカーの同定に有用な方法である。さらに糖尿病患者コホート研究を用いて、糖尿病性腎症の進展や治療効果を判定できる有用な新規尿中バイオマーカーを同定する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
- ② Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
- ③ Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
- ④ Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoe K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
- ⑤ Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
- ⑥ Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012
- ⑦ Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
- ⑧ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012

- ⑨ Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
- ⑩ Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
- ⑪ Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
- ⑫ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
- ⑬ Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
2. 学会発表
- ① PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steatohepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)2012年5月17日
- ② Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
- ③ ガレクチノミクス解析からグライコミクス解析へ 和田淳 平成24年度金沢大学戦略的研究推進プログラム—次世代重点研究プログラム—第2回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市)2012年9月14日
- ④ Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
- ⑤ The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
- ⑥ Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
- ⑦ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の機能解析 神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)2012年5月17日
- ⑧ メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)2012年5月17日
- ⑨ 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析 高塚哲全、四方賢一、小寺亮、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)2012年5月17日
- ⑩ 早期糖尿病性腎症における Telmisartan の抗酸化作用の検討 佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橘洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聡、梶谷展生、和田淳、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ

- 横浜（横浜市）2012年5月17日
- ⑪ ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月18日
- ⑫ 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑬ 2型糖尿病患者の腎症に関連する因子の横断的解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、梶谷展生、小寺亮、宮本聡、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑭ メタボリック症候群におけるマクロファージ IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4)の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、榎野博史、Evan Rosen 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑮ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑯ PSGL-1を阻害することにより、肥満マウスにおける内臓脂肪と肝臓の炎症とインスリン抵抗性が改善される 廣田大昌、四方賢一、佐藤千景、高塚哲全、宮本聡、小寺亮、梶谷展生、小川大輔、和田淳、片岡仁美、和田淳、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑰ 糖尿病性腎症モデルラットにおけるメタロチオネイン(metallothionein)の発現の検討 橋洋美、小川大輔、松下裕一、佐藤千景、和田淳、喜多村真治、前島洋平、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑱ 2型糖尿病における腎症の発症および進展
 に関する因子の解析 小野哲一郎、四方賢一、小比賀美香子、梶谷展生、小寺亮、宮本聡、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年5月19日
- ⑲ グライコー解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第55回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）2012年6月3日
- ⑳ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、榎野博史 第33回日本肥満学会 ホテルグランビア京都（京都市）2012年10月11日
- ㉑ ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博史 ホテルグランビア京都（京都市）2012年10月12日
- ㉒ メタボリックシンドロームにおける Gpnmbの意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、榎野博史 ホテルグランビア京都（京都市）2012年10月12日
- ㉓ GWAS で同定されたウエスト：ヒップ比関連 SNP と CT で測定した内臓脂肪面積との関係 堀田紀久子、中田由夫、松尾友明、和田淳、小谷一晃、嶺尾郁夫、浜口和之、益崎裕章、船橋徹、宮崎滋、徳永勝人、山田研太郎、田中喜代次、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、松澤佑次、中尾一和 第33回日本肥満学会 ホテルグランビア京都（京都市）2012年10月12日
- 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

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

血液サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討

研究分担者 江口 潤

岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科 助教

研究要旨

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。血清10 μLをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルの検出に成功し、さらに健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

研究分担者

江口潤（岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教）

A. 研究目的

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。さらに糖尿病性腎症(n=4)・膜性腎症(n=2)・IgA腎症(n=2)において健常人をコントロールとした血清のレクチンマイクロアレイによる糖鎖比較検討を行った。

B. 研究方法

血清の前処置

血清10 μLをヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。この6種類で総タンパク質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピニングカートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後サンプルに凝集（沈殿）が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREE0.5 BIOMAX-5k（Millipore）にサンプル500 μLをアプライして、10

倍濃縮を2回を行い、最終的には50 μLに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit（PIERCE）を用いてタンパク定量を行った。

Cy3標識およびレクチンアレイ解析

タンパク定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 μg/mLに調整し、うち20 μg/mLをCy3（100 μgタンパク標識用）と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過（Zeba Desalt Spin Columns 0.5 ml, PIERCE）して未反応のCy3を除き、回収されたタンパク量を1 μgとして、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 μg/mLの溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 μL（1ウエルあたり）をレクチンアレイにアプライして、20℃、暗所にて15時間反応させた。

測定および解析

LecChipの測定はGlycoStation™Reader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像（16 bit TIFF）をArray-Pto™Analyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

C. 研究結果

糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症とコントロールとの比較を図1-3に示した。タンパク濃度250ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。青が健常者コントロールで、紫色が各症例のシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。血清のレクチンアレイ解析では、いずれ症例においても、コントロ

ールとほぼ同様のプロファイルが得られ、糖尿病性腎症に一定した糖鎖構造の変化は見出せなかった。

D. 考察

血清のレクチンアレイを施行する際には血清中に多量に存在する主要タンパクを除去し、さらにその溶出バッファーからPBSへのバッファー交換が必要であることが判明した。バッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。

さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

E. 結論

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルにおいては、血清サンプルでは疾患特異的な変化が見出される可能性は低いと結論した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
- ② Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
- ③ Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012

- ④ Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Koderia R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
- ⑤ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
- ⑥ Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higuchi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013

2. 学会発表

- ① メタボリック症候群におけるマクロファージIRF4 (Interferon Regulatory Factor 4)の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、榎野博史、Evan Rosen 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012年5月19日
- ② メタボリック症候群におけるマクロファージIRF4の病態生理学的意義 江口潤 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012年5月19日
- ③ レプチン遺伝子の発現を制御する新規転写因子の同定 江口潤 第33回日本肥満学会 グランビア京都 (京都市) 2012年10月12日
- ④ Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
- ⑤ The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
- ⑥ Somuble form of transmembrane protein,

Gpmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013

- ⑦ ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 2012年5月18日
- ⑧ 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 2012年5月19日
- ⑨ グライコー解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第55回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 2012年6月3日
- ⑩ ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博

史 ホテルグランビア京都(京都市) 2012年10月12日

- ⑪ メタボリックシンドロームにおける Gpmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、榎野博史 ホテルグランビア京都(京都市) 2012年10月12日

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

図1 糖尿病性腎症

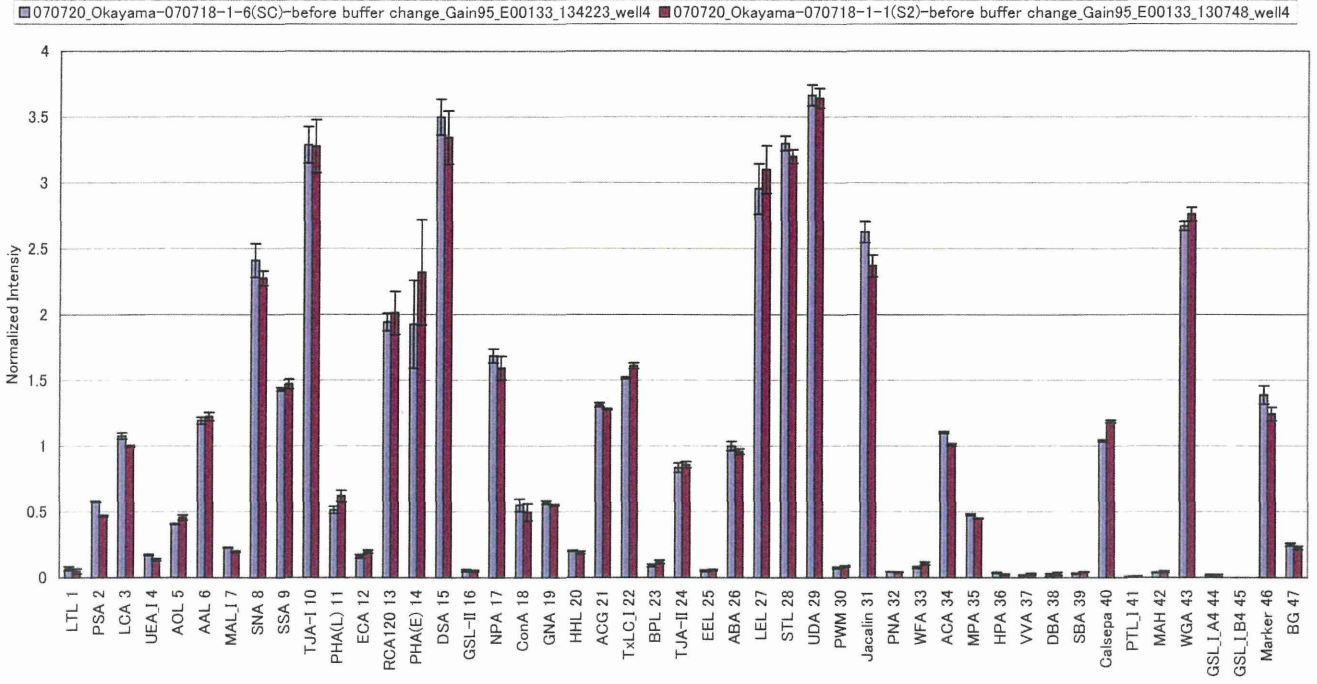


図2 膜性腎症

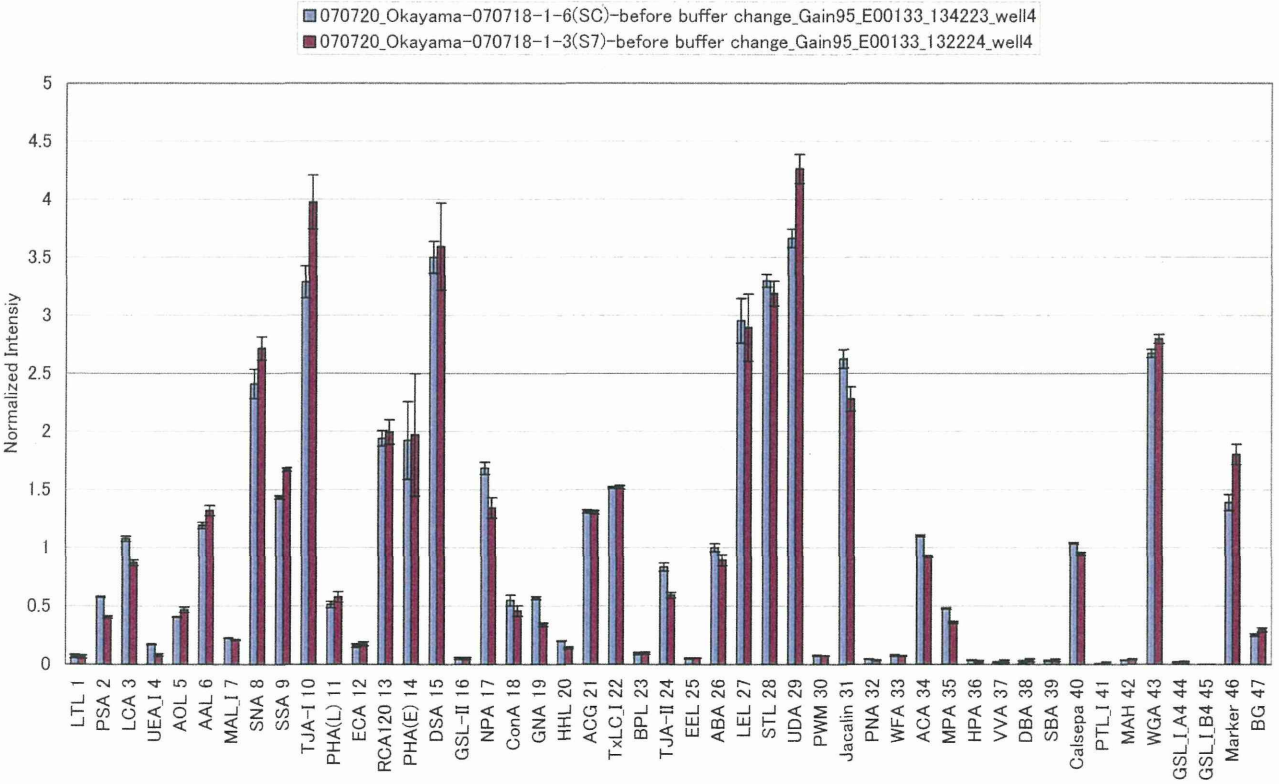
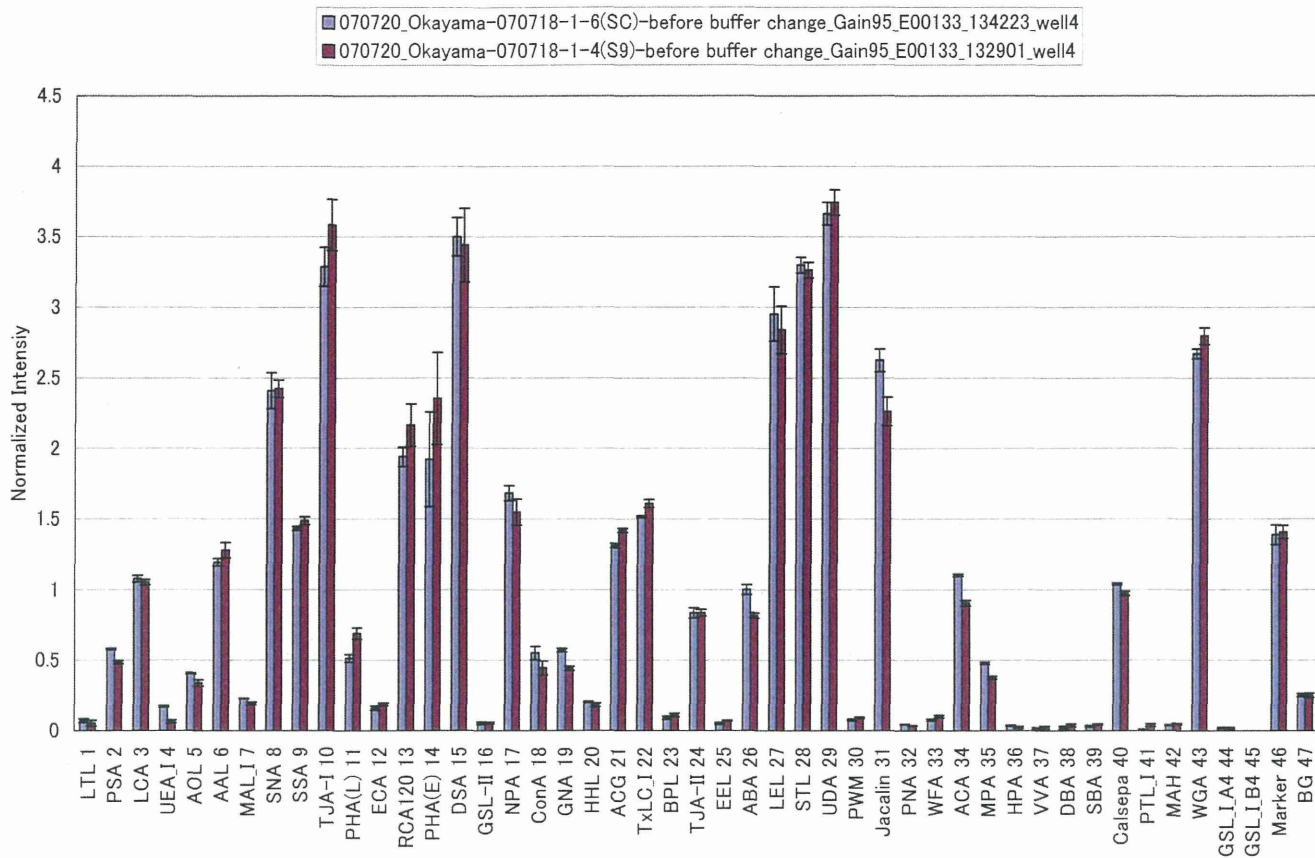


図3 I g A腎症



尿サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討

研究分担者 中司 敦子

岡山大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座 助教

研究要旨

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）による測定を行うための尿前処置の方法について検討した。尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 µLをヒト血清用アフィニティ除去スピナーカートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかったものの、尿サンプルの検討では、疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた。

研究分担者

中司敦子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・助教）

A. 研究目的

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）による測定を行うための尿前処置の方法について検討した。さらに糖尿病性腎症(n=4)・膜性腎症(n=2)・腎硬化症(n=2)において健常人をコントロールとした血清のレクチンマイクロアレイによる糖鎖比較検討を行った。

B. 研究方法

血清・尿の前処置

尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。血清および濃縮した尿10 µLをそれぞれヒト血清用アフィニティ除去スピナーカートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。この6種類で総タンパク質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピナーカートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後

サンプルに凝集（沈殿）が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREE0.5 BIOMAX-5k (Millipore) にサンプル500 µLをアプライして、10倍濃縮を2回行い、最終的には50 µLに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いてタンパク定量を行った。

Cy3標識およびレクチンアレイ解析

タンパク定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 µg/mLに調整し、うち20 µg/mLをCy3 (100 µgタンパク標識用)と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過（Zeba Desalt Spin Columns 0.5 ml, PIERCE）して未反応のCy3を除き、回収されたタンパク量を1 µgとして、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 µg/mLの溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 µL (1ウエルあたり)をレクチンアレイにアプライして、20°C、暗所にて15時間反応させた。

測定および解析

LecChipの測定はGlycoStation™Reader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像(16 bit TIFF)をArray-Pto™Analyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

C. 研究結果

糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症とコントロールとの比較を図1-2に示した。タンパク濃度

250ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。青が健常者コントロールで、紫色が各症例のシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。血清のレクチンアレイ解析では、いずれ症例においても、コントロールとほぼ同様のプロファイルが得られ、糖尿病性腎症に一定した糖鎖構造の変化は見出せなかった(図1)が、尿レクチンアレイでは疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた(図2)。

D. 考察

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイは、尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮することによって、後は血清と同様の処理によって測定が可能であることが判明した。さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。しかしながら尿サンプルの検討では、疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた。

E. 結論

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルにおいては、血清サンプルより尿サンプルの解析の方が、疾患特異的な変化が見出される可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
- ② Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoe K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
- ③ Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water

prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012

- ④ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
 - ⑤ Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
 - ⑥ Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
 - ⑦ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
 - ⑧ Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
2. 学会発表
 - ① Vaspin による動脈硬化制御とその作用機序の解明 中司敦子 動脈硬化Update2012 東京プリンスホテル(東京都) 2012年9月1日
 - ② PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steatohepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、榎野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市) 2012年5月17日
 - ③ Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic

- steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
- ④ The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
- ⑤ Somuble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
- ⑥ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の機能解析 神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、榎野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 5 月 17 日
- ⑦ メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、榎野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 5 月 17 日
- ⑧ ACAM (adipocyte adhesion molecule) の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 5 月 18 日
- ⑨ 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 5 月 19 日
- ⑩ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、榎野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 5 月 19 日
- ⑪ グライコーム解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、榎野博史 第 55 回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2012 年 6 月 3 日
- ⑫ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、榎野博史 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランビア京都 (京都市) 2012 年 10 月 11 日
- ⑬ ACAM (adipocyte adhesion molecule) の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、榎野博史 ホテルグランビア京都 (京都市) 2012 年 10 月 12 日
- ⑭ メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、榎野博史 ホテルグランビア京都 (京都市) 2012 年 10 月 12 日
- 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

図1 血清レクチンアレイ解析 (赤：腎硬化症、青：糖尿病性腎症、緑：膜性腎症)

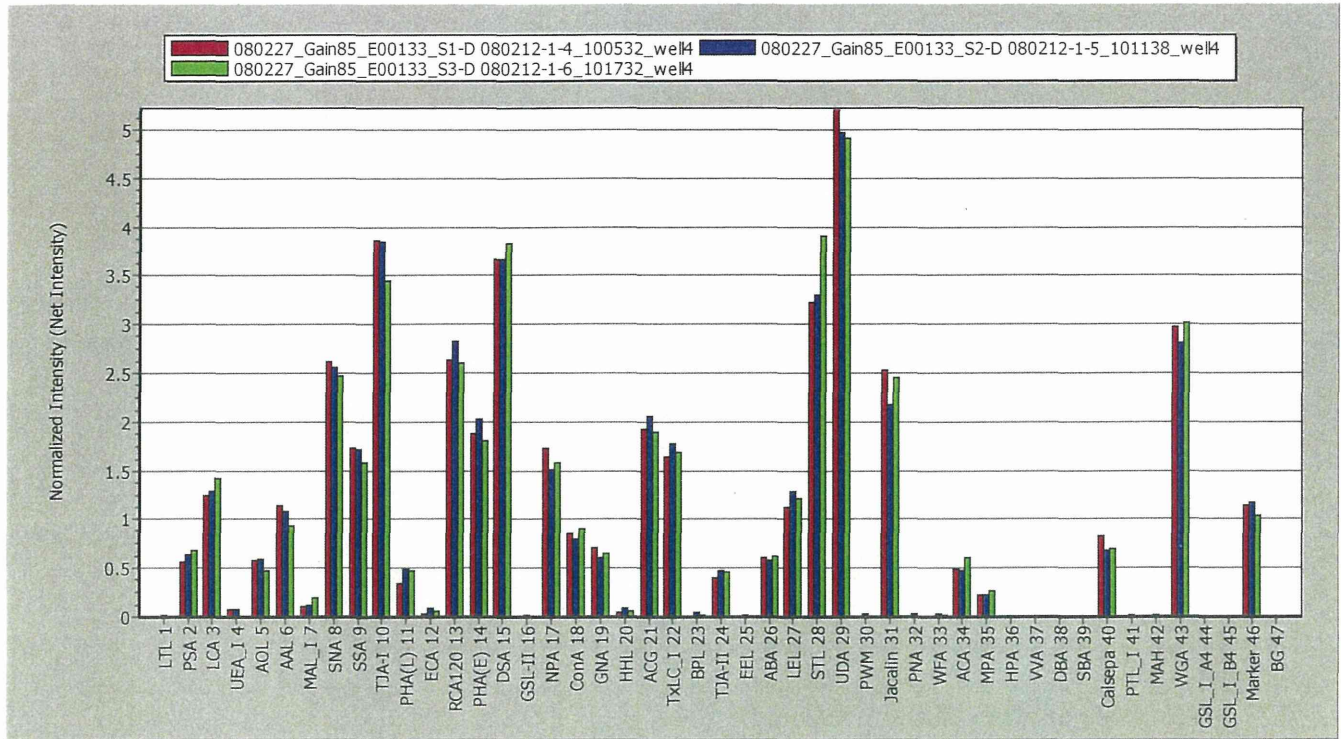
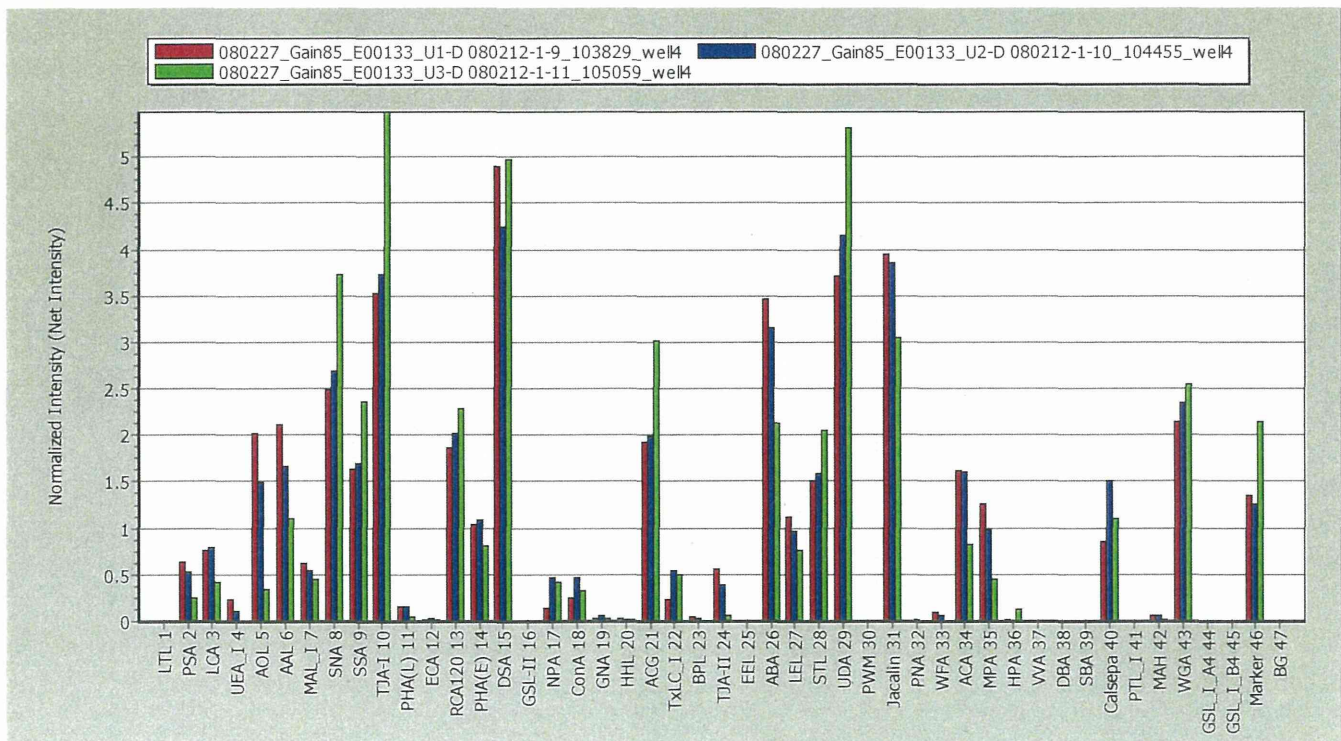


図2 尿レクチンアレイ解析 (赤：腎硬化症、青：糖尿病性腎症、緑：膜性腎症)



レクチンアレイ解析による新規バイオマーカーの同定

研究分担者 肥田 和之

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科 医長

研究要旨

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症1期(n=7)、2期(n=5)、3期(n=3)、4期(n=2)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展にともないシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められた。 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングは糖尿病性腎症の新規バイオマーカーを同定する上で有効な方法であると考えられる。

研究分担者

肥田和之（独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・医長）

A. 研究目的

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症1期(n=7)、2期(n=5)、3期(n=3)、4期(n=2)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。

B. 研究方法

尿の前処置

尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 μ Lをそれぞれヒト血清用アフィニティ除去スピナーカートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要タンパク質を除去した。この6種類で総タンパク質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピナーカートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後サンプルに凝集（沈殿）が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREEE0.5 BIOMAX-5k

(Millipore) にサンプル500 μ Lをアプライして、10倍濃縮を2回行い、最終的には50 μ Lに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いてタンパク定量を行った。

Cy3標識およびレクチンアレイ解析

タンパク定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 μ g/mLに調整し、うち20 μ g/mLをCy3 (100 μ gタンパク標識用)と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過 (Zeba Desalt Spin Columns 0.5 ml, PIERCE)して未反応のCy3を除き、回収されたタンパク量を1 μ gとして、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 μ g/mLの溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 μ L (1ウエルあたり)をレクチンアレイにアプライして、20°C、暗所にて15時間反応させた。

測定および解析

LecChipの測定はGlycoStation™Reader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像(16 bit TIFF)をArray-Pto™Analyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

C. 研究結果

糖尿病性腎症の各病期におけるレクチンアレイ解析の結果を図1に示した。タンパク濃度250ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。赤が健常者コントロールシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。病期の進行によってシグナルが増加し