

ているレクチンと（ピンク）、シグナルがほぼ同じかまたは低下しているレクチンに分類できた（緑）。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（図2）。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（図3）。 $\alpha$ 2-3シアル酸 (MAL-1) および $\alpha$ 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（図4）。

#### D. 考察

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイを施行したところ、糖尿病性腎症の病期の進行に伴って特徴的な糖鎖プロファイルの変化が同定できた。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、 $\alpha$ 2-3シアル酸 (MAL-1) および $\alpha$ 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。

#### E. 結論

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。

#### 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<sup>Cip1</sup> 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 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

- ④ 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
- 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]

##### 2. 学会発表

- ① 当院フットケア外来における糖尿病足病変難治症例の特徴とその対応 利根淳仁、伊勢田泉、綱嶋幸子、神原友美、稲毛由記、柴田祐助、諸國眞太郎、肥田和之 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 リラゲルチド投与6ヵ月後にHbA1c $\leq$ 6.5%を達成できる患者像の検討□内因性インスリン分泌能・体格指数の見地からの検証 肥田和之、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、利根淳仁 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
- ③ 糖尿病治療教育入院を契機に新規に末梢動脈疾患と診断され、血管内治療を行った症例の臨床的検討 小倉聡一郎、灘隆宏、上枝弘雄、江尻健太郎、更科俊洋、下川原裕人、溝口博喜、佐藤慎二、宮地晃平、宮地克維、松原広己、小川愛子、利根淳仁、伊勢田泉、肥田和之 第60回日本心臓病学会学術集会（金沢市）2012年9月15日
- ④ 岡山県統一糖尿病地域連携パスの運用状況と今後の展望 利根淳仁、太田徹、林恭加、柴田祐助、伊勢田泉、大森信彦、肥田和之 日本医療マネジメント学会 第11回岡山県支部学術集会（岡山市）2012年9月29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 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、腎症の進展に従い、シグナルが低下する傾向がみられた。

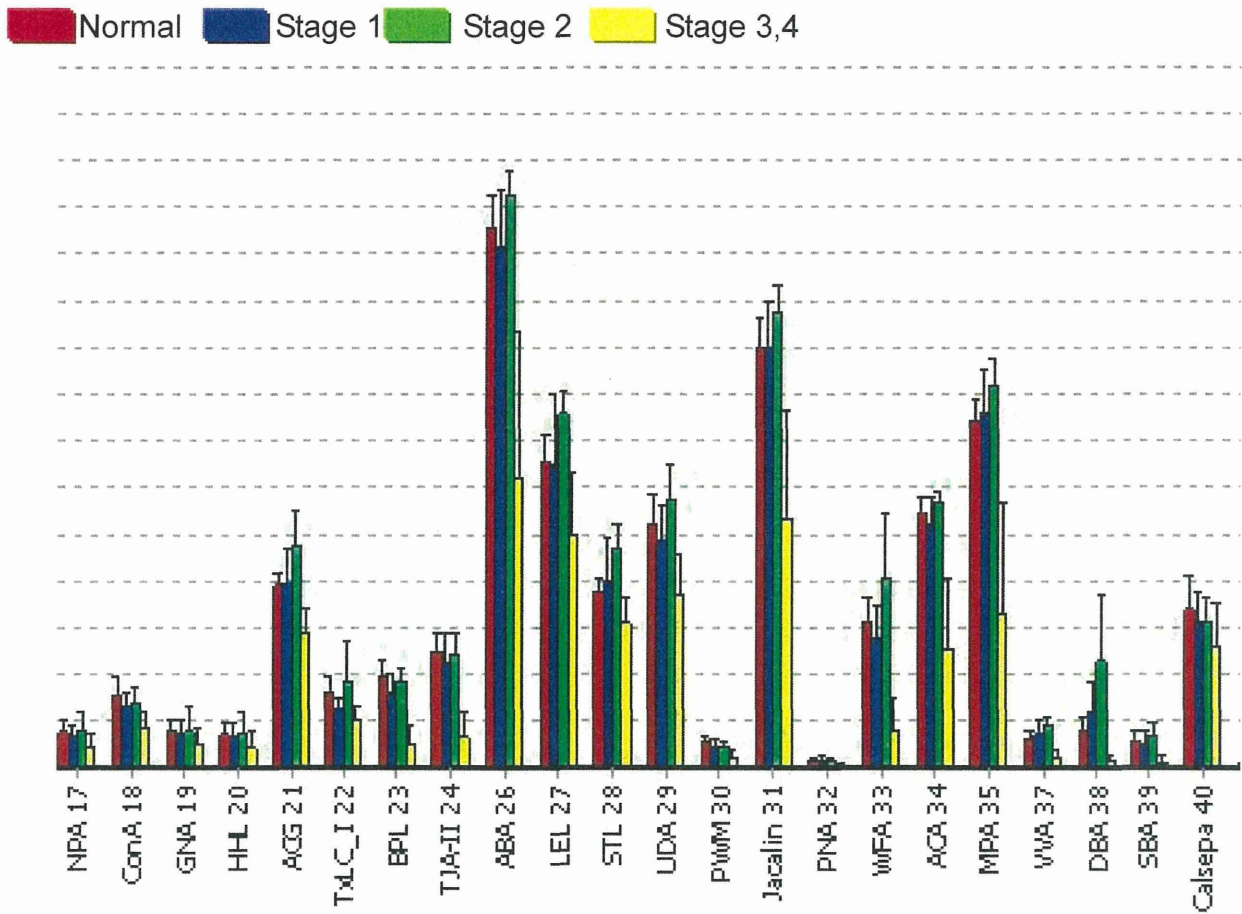


図2 N型糖鎖関連レクチン (RCA120、PHA(E)、DSA) では、2期まではシグナルは増加するが、さらに進行すると低下する傾向がみられた。

■ Normal ■ Stage 1 ■ Stage 2 ■ Stage 3,4

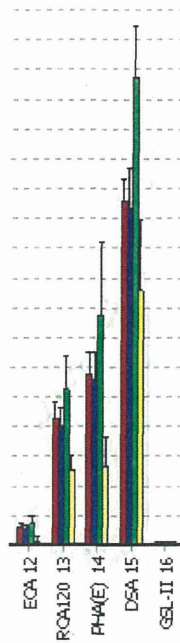
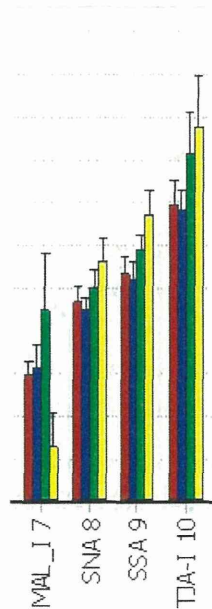


図3  $\alpha$ 2-3シアル酸 (MAL-1) および $\alpha$ 2-6シアル酸関連レクチン (SNA、SSA、TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向がみられた。

■ Normal ■ Stage 1 ■ Stage 2 ■ Stage 3,4





## レクチンカラムによる糖タンパク質の精製

研究分担者 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

### 研究要旨

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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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。

### 研究分担者

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）

#### A. 研究目的

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、 $\alpha$ 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で $\alpha$ 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することとした。

#### B. 研究方法

尿サンプルは100 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。SSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー（Lectin-Agarose Set-III, SSA-Agarose）をBioLogic LPシステムII（#731-8300X2, BIO-RAD）を用いて施行した。まず6.0 mLのPBSを0.2 mL/minの速度で30分間平衡化を行った。次に尿サンプル1.0 mLをサンプルループにアプライして0.1 mL/minの速度で10分間かけてPBSによってサンプルをロードした。さらにPBSを0.1 mL/minの速度でPBS 7.0 mLを70分間かけて洗浄を行った。さらにサンプルループに溶出バッファー5.0 mL（0.2M lactose）をアプライしてPBSを0.1 mL/minの流量で60分間かけて溶出した。さらに0.5 mL/minの速度で10.0 mLのPBSを用いて洗浄を行った。溶出の過程で溶出サンプルを5分毎にフラクションコレクターで0.5 mL毎に分

注し、洗浄過程では10分毎にフラクションコレクターで1.0 mL毎に分注した。さらに溶出サンプルをSDS-PAGEで展開して解析した。

#### C. 研究結果

SSA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って得られたタンパク質をSDS-PAGEに展開したところ、 $\alpha$ 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（図1）。

#### D. 考察

糖尿病性腎症の尿サンプルのレクチンアレイ解析では、 $\alpha$ 2-6シアル酸関連レクチンへの結合性が、腎症の進展に従って上昇した。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。これらの糖タンパク質は糖尿病性腎症の新しい尿中バイオマーカーの候補であると考えられる。

#### E. 結論

レクチンアガロースカラムによるアフィニティークロマトグラフィーは、レクチンアレイによって得られた結果から、さらにその糖タンパク質を同定する上で有用な方法であることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishimura M, Kato M, Tanaka T, Todo R, Tone A,

Yamada K, Ootani S, Kawabe Y, Yoshizumi H, Higashi K, Hoshiyama Y. Significance of estimating the glomerular filtration rate for the management of hypertension in type 2 diabetes with microalbuminuria. *Hypertens Res*, in press.

## 2. 学会発表

- ⑤ 当院フットケア外来における糖尿病足病変難治症例の特徴とその対応 利根淳仁、伊勢田泉、綱嶋幸子、神原友美、稲毛由記、柴田祐助、諸國眞太郎、肥田和之 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
- ⑥ リラグルチド投与6ヵ月後にHbA1c $\leq$ 6.5%を達成できる患者像の検討□内因性インスリン分泌能・体格指数の見地からの検証 肥田和之、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、利根淳仁 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
- ⑦ 糖尿病治療教育入院を契機に新規に末梢動脈疾患と診断され、血管内治療を行った症例の臨床的検討 小倉聡一郎、灘隆宏、上枝弘雄、江尻健太郎、更科俊洋、下川原裕人、溝口博喜、佐藤慎二、宮地晃平、宮地克維、松原広己、小川愛子、利根淳仁、伊勢田泉、肥田和之 第60回日本心臓病学会学術集会（金沢市）2012年9月15日
- ⑧ 岡山県統一糖尿病地域連携パスの運用状況

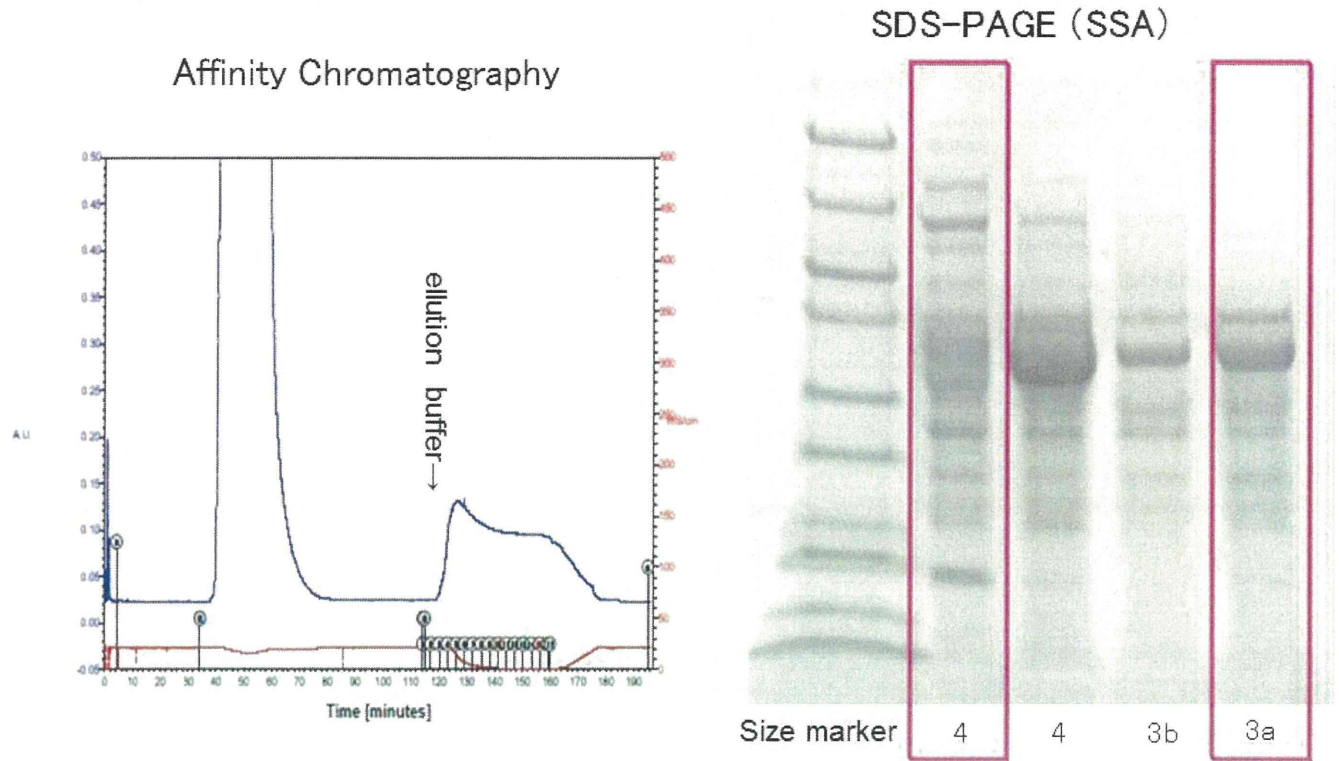
と今後の展望 利根淳仁、太田徹、林恭加、柴田祐助、伊勢田泉、大森信彦、肥田和之 日本医療マネジメント学会 第11回岡山県支部学術集会（岡山市）2012年9月29日

## 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 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で蛋白を精製、SDS-PAGEで展開した。 $\alpha$ 2-3シアル酸、 $\alpha$ 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蛋白が、腎症に進展に伴って増加し病期による変化がはっきりと認められた。

## 糖タンパクの精製



## 質量解析による新規バイオマーカーの同定

研究分担者 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

### 研究要旨

糖尿病性腎症1期、2期、3期の患者の尿を用いて、SSA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で $\alpha$ 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。

### 研究分担者

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

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、 $\alpha$ 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 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で  $\alpha$ 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。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。

### B. 研究方法

#### 酵素消化および質量分析

SSA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って得られたタンパク質をジチオスレイトール(DTT)およびヨードアセトアミド(IAA)によって還元処理した後に、0.1  $\mu$ gのシークエンシンググレードのトリプシンで酵素消化(30 $^{\circ}$ C、一晚)を実施した。消化後に50%アセトニトリル5%蟻酸溶液でペプチドを抽出した。抽出されたペプチドを nanoUPLC (nanoACQUITY UPLC, ウォーターズ社)、Q-ToF micro (ウォーターズ社)を用いて解析した。UPLC条件としてはトランプカラム(5.0  $\mu$ m Symmetry C18, 180  $\mu$ mID  $\times$  2 cm, S/N 0258110472D108)、カラム (1.7  $\mu$ m BEH 130 C18, 100  $\mu$ mID  $\times$  10 cm, S/N 0193110811A119)を用いてカラム温度は30 $^{\circ}$ Cとした。移動相としてはA液：水0.1%蟻酸、B液：アセ

トニトリル0.1%蟻酸を用いた。流速は400 nL/minで施行した。質量分析はMS測定はMasslynx ソフトウェア(マイクロマス社)のサーベイモードで行った。

#### データベース検索

MS/MS 解析により得られたデータは、MassLynx (マイクロマス社)によりデコンボリューション処理を行った。得られたピークリストファイル (pk1 ファイル) に対して、Mascot (マトリックサイエンス社)を用いて、NCBI Inr および Swiss-Prot の最新のデータベース内で一致するタンパク質の検索を行った。修飾に関する検索条件は、システイン残基のカルバミドメチル化とメチオニンの酸化を標準とした。

### C. 研究結果

質量解析の結果表に示すような糖タンパク質が同定された。トップにランクされるアルブミンは糖鎖を有さないことと、尿中に最も多く存在するタンパク質であることからコンタミネーションと考えられた。その他には免疫グロブリン(Ig gamma-1 chain C region, Ig gamma-2 chain C region, Ig alpha-1 chain C region, Ig lambda-2 chain C regions)・補体コンポーネント(Complement C4-A, Plasma protease C1 inhibitor, Complement C3)・凝固因子(Antithrombin-III, Prothrombin)などのフラグメントが得られた。その他はシアル酸と糖鎖として有する糖タンパク質が同定されており、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。

### D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 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
- 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, 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]

### 2. 学会発表

- ① 当院フットケア外来における糖尿病足病変難治症例の特徴とその対応 利根淳仁、伊勢田泉、綱嶋幸子、神原友美、稲毛由記、柴田祐助、諸國眞太郎、肥田和之 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 リラグルチド投与6ヵ月後にHbA1c $\leq$ 6.5%を達成できる患者像の検討□内因性インスリン分泌能・体格指数の見地からの検証 肥田和之、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、利根淳仁 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
- ③ 糖尿病治療教育入院を契機に新規に末梢動脈疾患と診断され、血管内治療を行った症例の臨床的検討 小倉聡一郎、灘隆宏、上枝弘雄、江尻健太郎、更科俊洋、下川原裕人、溝口博喜、佐藤慎二、宮地晃平、宮地克維、松原広己、小川愛子、利根淳仁、伊勢田泉、肥田和之 第60回日本心臓病学会学術集会（金沢市）2012年9月15日
- ④ 岡山県統一糖尿病地域連携パスの運用状況と今後の展望 利根淳仁、太田徹、林恭加、柴田祐助、伊勢田泉、大森信彦、肥田和之 日本医療マネジメント学会 第11回岡山県支部学術集会（岡山市） 2012年9月29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



表 Swiss-Prot データベース検索結果一覧

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI	Score*1	a.a.
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	52	21.13	3829	609
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	23	1.61	800	698
3	HPT_HUMAN	Haptoglobin	17	3.1	683	406
4	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	10	2.56	601	330
5	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	8	0.99	227	362
6	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	6	4.73	516	106
7	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	10	1.54	422	353
8	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	18	0.46	417	1474
9	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	10	1.16	392	418
10	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	8	1.53	251	267
11	AMBP_HUMAN	Protein AMBP (alpha-1-microglobulin)	7	0.88	226	352
12	HEMO_HUMAN	Hemopexin	7	0.62	214	462
13	LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	4	1.45	204	106
14	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	2	0.04	147	1744
15	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	2	0.06	127	1065
16	IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	4	0.22	94	500
17	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1	0.07	94	495
18	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	94	190
19	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1 (orosomucoid)	3	0.56	82	201
20	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	1	0.07	74	485
21	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	2	0.07	72	464
22	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	2	0.05	71	644
23	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	70	367
24	PGRP2_HUMAN	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1	0.06	62	576
25	CO3_HUMAN	Complement C3	5	0.02	55	1633
26	THRB_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	31	622
27	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1	0.07	30	474
28	MTUS1_HUMAN	Microtubule-associated tumor suppressor 1	1	0.03	26	1270

\*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index)、ノンラベルで半定量する場合の指標。  
下式で計算。

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}} - 1}$$

\*2: Score が高いほど間違いである確率が低い。  $10 * \text{LOG}_{10}(P)$ ,  $P < 0.05$  のものを表示

## 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

研究代表者 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

### 研究要旨

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。

### 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

レクチンアレイ・レクチンアフィニティークロマトグラフィー・質量解析によって同定された尿中の糖タンパク質は糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーの候補となる。現在尿中微量アルブミンが糖尿病性腎症の進展を予測するゴールドスタンダードと言えるが、尿中微量アルブミンをゴールドスタンダードとして比較する限りは、それを凌駕するような新規尿中バイオマーカーであるかどうかは判明しない。そこで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。

### B. 研究方法

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。これらのサンプルを用いて、本研究の過程で判明した新規尿中バイオマーカーの測定を行い、糖尿病性腎症の予後判定に有用な因子を同定する予

定である。またゲノムDNAについては同定されたバイオマーカーの遺伝子上の一塩基多型（SNPs）の検討を予定している。

### 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

岡山大学病院および岡山県内の7病院で、平成24年度に総計725例の症例の組み入れが終了し、患者の血清・尿・ゲノムDNAを保存した。平成25-26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予定である。

岡山大学病院	151	例
岡山医療センター	68	例
岡山済生会	49	例
倉敷中央病院	90	例

榊原病院	50	例
津山中央病院	203	例
岡山赤十字病院	100	例
岡山市民病院	14	例
総計	275	例

## D. 考察

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

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。

## 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<sup>Cip1</sup> 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, 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
- 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. *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, 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 Renin angiotensin system inhibition in diabetic kidney disease: What's new? Hirofumi Makino, Clinical nephrology conference ASN Kidney Week 2012, San Diego convention center, San Diego, California, USA, November 2, 2012
- ② Epidemiology and Clinical Feature of Medium to Small Vessel Vasculitis Overview, Hirofumi Makino, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA 2012, Shinagawa, Tokyo, Japan, March 28-31, 2012
- ③ Japanese effort for prevention and management of CKD; lessen from CKD-JAC, International Symposium on CKD Prevention and Control, Hyundai Hotel, Gyeongju, Korea, October 13, 2012
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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
- ⑨ 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
- ⑩ 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
- ⑪ 期糖尿病性腎症における Telmsartan 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
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 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
- ⑬ 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、槇野博史 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 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、槇野博史 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
- ⑮ 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 橘洋美、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、槇野博史 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 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、槇野博史 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 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、槇野博史 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
- 21 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、槇野博史 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
- 22 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、槇野博史 ホテルグランビア京都（京都市）2012年10月12日
- 23 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、槇野博史 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

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

##### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
榎野博史	糖尿病とCKDの関係	榎野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	1-4
和田淳	尿検査の意義－蛋白尿－	榎野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	10-11
江口潤	HbA1cを血糖コントロール指標としてみる場合の注意点	榎野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	19-22
中司敦子	血糖コントロールの指標としてみる場合の注意点	榎野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	29-31

##### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wada J and Makino H	Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy.	<i>Clin Sci</i>	124(3)	139-152	2013
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 <sup>Cip1</sup> pathway in adipocytes.	<i>J Pathol</i>	226(5)	784-795	2012
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).	<i>Diab Vasc Dis Res</i>	10(1)	93-96	2013

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.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	97(7)	E1202-1207	2012
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.	<i>Hepatology</i>	56(3)	912-921	2012
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.	<i>Int J Nephrol Renovasc Dis</i>	5	91-96	2012
Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H.	Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan.	<i>Clin Exp Nephrol</i>	17(1)	51-58	2013
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.	<i>Diabetes</i>	61(11)	2823-2832	2012

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.	<i>J Am Soc Nephrol</i>	23(11)	1835-1846	2012
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.	<i>BMC Nephrol</i>	13(1)	163	2012
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.	<i>Nephron Exp Nephrol</i>	121(3-4)	e97-e108	2013
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.	<i>Circ Res</i>			2013 Jan 10. [Epub ahead of print]
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.	<i>BMC Nephrol</i>	14	23	2013



