

201316003A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成26（2014）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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 平成25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. 尿サンプルのレクチンアレイ解析による新規バイオマーカーの同定 江口潤、中司敦子、勅使川原早苗	-----	9
2. 尿中バイオマーカーのELISAによる測定 江口潤、中司敦子、勅使川原早苗	-----	18
3. 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、肥田和之、宮下雄博、松岡孝、安藤晋一郎	-----	28
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	32

I. 平成25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
	勅使川原早苗	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 地域医療人材育成講座	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
	宮下雄博	岡山赤十字病院・総合内科	健診部長
	松岡 孝	倉敷中央病院・糖尿病内科	主任部長
	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
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
	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
	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
	清水一紀	心臓病センター榊原病院・糖尿病内科	内科部長
	梶谷展生	津山中央病院	副部長
	羽井佐茂	岡山市立市民病院・糖尿病センター	センター長

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、予後を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尿の糖鎖プロファイルを網羅的に解析した。健常人と糖尿病性腎症患者の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。健常人(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)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。さらにSSAレクチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製したサンプルをLC-MS/MSによるショットガン解析を施行したところ28種類の糖蛋白質を同定した。これらの糖蛋白質のうち8種類がELISA法で測定が可能であり、そのうち測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomucoid, fetuin-Aであった。 α 1-microglobulin, orosomucoid, fetuin-Aは既報でシアル酸蛋白質であることが報告されているため、これら3つの尿中マーカーについて糖尿病や腎症の臨床データとを横断的に比較検討を行った。 α 1-microglobulinは腎臓間質マーカーとして、またorosomucoidは糖尿病性腎症の尿中マーカーとして報告されているが、尿中fetuin-A排泄量についてはELISAによる尿中濃度の検討はまだ報告がないが、尿中fetuin-A排泄量は尿中アルブミン排泄量と正の相関を、eGFRと負の相関を示し、新たな糖尿病性腎症の尿中バイオマーカーであると考えられた。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尿中fetuin-A排泄量を測定し糖尿病性腎症の新たなバイオマーカーとしての意義を検討予定である。

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）、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）、勅使川原早苗（岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・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）、宮下雄博（岡山赤十字病院・総合内科・健診部長）、松岡孝（岡倉敷中央病院・糖尿病内科・主任部長）、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）

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。しかしこれらの糖鎖修飾は、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蛋白質であるO-GlcNAcレベルを増加させると報告された(JBC 266:4706-4712, 1991)。その後、動物においてヘキ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)、糖尿病性腎症発症におけるマトリックス蛋白生成に関与している

TGF- β の転写活性が亢進すること (*JCI* 101:160-169, 1998)、またヘキソサミン経路により糖尿病性腎症でみられる細胞周期の停止とメサンギウム細胞の肥大化が誘導されることもわかった (*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るため、多くの症例を検討することは困難であった。GP バイオサイエンスが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種々の病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した。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、腎症の進行を予測しうるマーカーの候補として fetuin-A を同定した。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、尿中 fetuin-A 排泄量を ELISA によって測定し、腎症の進展を予測するバイオマーカーとしての意義を検証する予定である。

B. 研究方法

健常人(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)の糖鎖プロファイリングをレクチンアレイによって検討したところ、 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蛋白質を精製した。さらに質量解析によってこれらの糖蛋白質の同定を行った。

糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補のうちELISA測定系が入手可能である8因子について糖尿病性腎症患者の尿サンプルを用いて測定した。尿サンプルは糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=36)、微量アルブミン尿期(n=25)、顕性蛋白尿期(n=24)の患者から採取した。N-抗血清ハプトグロビン、N-抗血清 α 2-マクログロブリン、N-抗血清セルロプラスミン、N-抗血清 α 2-アシッドグリコプロテイン (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス)、アポA-Iオート・N「第一」(積水メディカル)、LZテスト栄研 α 1-M(栄研化学)、Human Fetuin-A ELISA (BioVender)、Human Total Angiotensinogen Assay Kit-IBL (IBL)を用いて尿中の濃度を測定し、クレアチニン補正を行うことにより検討した。

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の有用性を検証することとした。岡山大学病院および岡山県内の7病院で、糖尿病患者のゲノムDNAを平成24年に、血清・尿を平成24-26年度にわたって1年間に一度保存する。

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

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。

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、糖蛋白質を精製してSDS-PAGEで解析したところ複数の糖蛋白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、28種類の糖蛋白質を同定した。糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補のうちELISA測定系が入手可能である8因子であるhaptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenのうち測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A, angiotensinogenであった。 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aは既報でシアル酸蛋白質であることが報告されているため、これら3つの尿中マーカーについて糖尿病や腎症の臨床データとの横断的に比較検討を行った。なお α 1-microglobulinは腎臓の間質マーカーとして保険収載されており、またorosomuroidは糖尿病性腎症の尿中マーカーとして報告されているが、尿中fetuin-AについてはELISAによる尿中濃度の検討はまだ報告がない。

アルブミン尿のステージ（A1, A2, A3）の進行に従って、年齢、血清総蛋白、血清アルブミン、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、HDL-コレステロール、eGFR、尿中アルブミン排泄量（ACR）は有意差を持って変化した（Kruskal-Wallisテスト）。さらに α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度のいずれもが有意差をもってアルブミン尿の病期の進行に従って上昇した。さらにGFRステージ（G1, G2, G3, G4）の進行に従って、血清総蛋白、血清アルブミン、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、eGFR、尿中アルブミン排泄量（ACR）が有意差を持って変化した（Kruskal-Wallisテスト）。またアルブミン尿病期

と同様に、GFRの病期の進行によって α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度のいずれもが有意差をもって上昇した。

α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度は血清クレアチニン、尿素窒素、尿中アルブミン排泄量（ACR）と正の相関を示し、また血清アルブミン、HDL-コレステロール、eGFRと負の相関を示した。eGFR、尿中アルブミン排泄量（ACR）、HDL-コレステロールを独立変数として、尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量をそれぞれ従属変数として重回帰分析を施行した。尿中 α 1-microglobulin排泄量に関しては、eGFRと尿中微量アルブミン（ACR）が、尿中fetuin-A排泄量に関しては尿中アルブミン排泄量（ACR）が有意差をもって独立した説明変数であることが示された。さらに尿中orosomuroid排泄量に関しては、尿中アルブミン排泄量（ACR）とHDL-コレステロールが有意差をもって独立した説明変数であることが明らかとなった。

微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量を検討した。ステップワイズ多項ロジスティック解析では微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中fetuin-A排泄量のみが採択された。

D. 考察

本研究においてシアル酸含有糖蛋白質であるfetuin-Aの尿中排泄量が安定して測定可能であり、かつ糖尿病性腎症の新たな尿中バイオマーカーであることが示された。Fetuin-Aは肝臓より産生される64 kDaの糖蛋白質である。Fetuin-Aは肥満状態で発現が亢進し、それは脂肪細胞におけるアディポネクチンmRNAの発現を抑制して血清アディポネクチン濃度を低下させると報告されている。それによってインスリン抵抗性、糖尿病と腎症の進展が促進されると考えられている。さらにfetuin-Aは遊離脂肪酸(FFA)の担体であり、それがToll-like receptor 4 (TLR4)に結合することも報告されている。FFA-fetuin-A複合体はTLR4受容体を刺激して脂質による炎症を惹起して糖尿病における慢性炎症とそれによるインスリン抵抗性を惹起していると最近報告されている。

糖尿病患者の血中fetuin-A濃度は大血管障害と相関があるという報告がある一方、細小血管障害とは相関がないとの報告や、微量アルブミン尿が陽性の糖尿病患者や動脈硬化の認められる糖尿病では血中fetuin-A濃度が低いとの報告もあり、一定の見解が得られていない。また尿中fetuin-A

排泄量は尿中アルブミン排泄量 (ACR) と正の相関を呈し、eGFRと負の相関を呈した。さらに横断研究ではあるが、ステップワイズ多項ロジスティック解析では微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中fetuin-A排泄量のみが採択された。従って本研究によって糖尿病性腎症の進展を予測するバイオマーカーの候補であることが示された。尿中fetuin-A排泄量の増加は肝臓での産生増加や糸球体毛細血管における透過性、あるいは尿細管の再吸収など複数の要因が関与していると考えられる。

さらに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の候補としてfetuin Aの意義を確認するに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とレクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖蛋白質の同定は、尿中新規バイオマーカーの同定に有用な方法であり、このたびfetuin-Aを同定した。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としての尿中fetuin-A排泄量の有用性を確認する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear receptors as an emerging therapeutic target. *Acta Medica Okayama* 67(3), 129-134, 2013
- ② Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H. Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 2013
- ③ Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary

angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013

- ④ Fujiwara D, Takahashi K, Suzuki T, Shii M, Nakashima Y, Takekawa S, Yoshida A, Matsuoka T. Postprandial serum C-peptide value is the optimal index to identify patients with non-obese type 2 diabetes who require multiple daily insulin injection: Analysis of C-peptide values before and after short-term intensive insulin therapy. *Journal of Diabetes Investigation* 4(6), 618-625, 2013

2. 学会発表

- ① 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(U-CARE 研究) 和田淳、井上謙太郎、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、樋口千草、渡邊真由、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
- ② Vaspinによる小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 中司敦子、和田淳、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
- ③ 糖尿病性腎症におけるPEMT阻害の意義 中司敦子、和田淳、渡邊真由、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
- ④ マウス腎および培養腎細胞における核内受容体の発現と高糖濃度刺激による発現変化の検討 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
- ⑤ 嚢胞形成の新規分子機構—ACAM/CLMP欠損マウスの解析— 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、佐藤美和、寺見直人、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月12日
- ⑥ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白Gpnmbの脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、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 第56回日本糖尿病学会年次学術集会(熊本)平成25年5月16日

日

- ⑦ 2型糖尿病のインスリン分泌の経年低下指標には何が最も役に立つか：断面調査より中井志保、鈴木貴博、和田侑子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、吉田淳、松岡孝、高橋健二 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月16日
- ⑧ 糖尿病心血管系自律神経障害の早期診断における安静時心拍数の重要性 志伊真和、松岡孝、和田侑子、中井志保、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、吉田淳、鈴木貴博、高橋健二 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月16日
- ⑨ Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. J Wada, A Nakatsuka, S Teshigawara, K Murakami, T Terami, K Inoue, A Katayama, C Higuchi, M Watanabe, J Eguchi, H Makino. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑩ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9-Tim-3 経路の意義 勅使川原早苗、和田淳、神崎資子、江口潤、中司敦子、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑪ ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP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、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑫ 糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑬ 糖毒性患者にインスリン療法導入後、6ヶ月以内に離脱可能を推測させる導入前における内因性インスリン分泌能マーカーの検討 肥田和之、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、利根淳仁 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑭ CSII を施行されている1型糖尿病患者の血糖コントロールに影響を与える因子について 利根淳仁、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、真邊香江、藤原喜子、肥田和之 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑮ 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、小川大輔、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、片山晶博、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑯ メタボリックシンドロームにおける脂肪組織由来血清 miRNA の同定 樋口千草、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、江口潤、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑰ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、江口潤、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑱ メタボリック症候群におけるアルブミン尿と炎症およびインスリン抵抗性についての検討 梶谷展生、四方賢一、石井啓太、平田教至、小寺亮、廣田大昌、和田淳、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑲ 当院におけるシタグリプチンの使用経験 重松照伸、宮下雄博、岡田震一、藤井総一郎、早川信彦、岡崎守宏 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑳ 高齢糖尿病患者におけるグリメピリドとシタグリプチン併用症例の検討 宮下雄博、早川信彦 第55回日本老年医学会学術集会（大阪）平成25年6月4日
- ㉑ Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. D Ogawa, J Eguchi, H Tachibana, C Sato-Horiguchi, T Hatanaka, A Nakatsuka, J Wada, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 22, 2013
- ㉒ Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. A Nakatsuka, J Wada, K Murakami, T Terami, J Eguchi, D Ogawa, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ㉓ ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) / CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. K Murakami, J Wada, J Eguchi, D Ogawa, T Terami, N Terami, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013

- ②④ 肥満において Pemt 欠損がもたらす脂肪肝炎とエピゲノム 中司敦子、和田淳、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、片山晶博、寺見隆宏、勅使川原早苗、村上和敏、江口潤、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日
- ②⑤ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 Gpnmb の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日
- ②⑥ ビルダグリプチンと速効型インスリン分泌促進薬の併用療法の有用性 木村友香、松岡孝、合田悟、和田美輝、中井志保、和田侑子、三小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、鈴木貴博、高橋健二 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日
- ②⑦ 非肥満 2 型糖尿病に対するインスリン治療選択指標 藤原大介、高橋健二、合田悟、和田美輝、木村友香、中井志保、和田侑子、三

小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、武川郷、鈴木貴博、松岡孝 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日

- ②⑧ 短期入院で決定した肥満 2 型糖尿病に対するインスリン療法の分析 鈴木貴博、合田悟、和田美輝、中井志保、和田侑子、木村友香、三小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、松岡孝、高橋健二 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日
- ②⑨ 高齢発症 1 型糖尿病患者の膵島関連抗体に関する分析 三小田亜希子、松岡孝、藤原大介、武川郷、鈴木貴博、高橋健二 第 25 回日本老年医学会中国地方会（岡山）平成 25 年 11 月 23 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

尿サンプルの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 江口潤・岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教

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

研究分担者 勅使川原早苗・岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・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™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)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。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糖蛋白質を同定したところ、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどが得られた。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有するもの同定されており、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。

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）、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）、勅使川原早苗（岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・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™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)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。さらに腎症の進行によって結合性の増加が認められたレクチンであるSSAレクチンを用いたカラムによって糖蛋白質を精製し、さらに質量解析によって新規バイオマーカーの候補を同定する。

B. 研究方法

尿の前処置

尿は50 mLをセントリコンで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種類の主要蛋白質を除去した。この6種類で総蛋白質の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。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) を用いて蛋白定量を行った。

Cy3標識およびレクチンアレイ解析

蛋白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をCy3 (100 μ g蛋白標識用)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、回収された蛋白量を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(LecChip)にアプライして、20°C、暗所にて15時間反応させた。レクチンアレイ上のレクチンのリストは表1に提示した。

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。

SSAレクチンカラムクロマトグラフィー

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。

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蛋白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 μ gのシーケンシンググレードのトリプシンで酵素消化(30°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条件としてはトラップカラム(5.0 μ m Symmetry C18, 180 μ mID \times 2 cm, S/N 0258110472D108)、カラム(1.7 μ m BEH 130 C18, 100 μ mID \times 10 cm, S/N 0193110811A119)を用いてカラム温度は30°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(マトリックスサイエンス社)を用いて、NCBIInrおよびSwiss-Protの最新のデータベース内で一致する蛋白質の検索を行った。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

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。蛋白濃度250 ng/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ているレクチンと、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。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。

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蛋白質を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蛋白質が、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2)。質量解析の結果表2・表3に示すような糖蛋白質が同定された。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蛋白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)・凝固系因子(Antithrombin-III, Prothrombin)などのフラ

グメントが得られた。その他同定されたものとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどがある。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有する糖蛋白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

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、 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。

糖尿病性腎症の尿サンプルのレクチンアレイ解析では、 α 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、糖蛋白質を精製したところ、複数の糖蛋白質が病期の進展に従って増加していることが判明した。これらの糖蛋白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。糖尿病性腎症の新規バイオマーカーとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenが、その候補として今後検討すべきであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear

receptors as an emerging therapeutic target. *Acta Medica Okayama* 67(3), 129-134, 2013

- ② Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H. Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 2013
- ③ Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013

2. 学会発表

- ① 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(U-CARE 研究) 和田淳、井上謙太郎、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、樋口千草、渡邊真由、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
- ② Vaspinによる小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 中司敦子、和田淳、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
- ③ 糖尿病性腎症におけるPEMT阻害の意義 中司敦子、和田淳、渡邊真由、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
- ④ マウス腎および培養腎細胞における核内受容体の発現と高糖濃度刺激による発現変化の検討 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
- ⑤ 嚢胞形成の新規分子機構—ACAM/CLMP欠損マウスの解析— 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、佐藤美和、寺見直人、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月12日
- ⑥ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白Gpnmbの脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口

- 潤、村上和敏、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 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 16 日
- ⑦ Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. J Wada, A Nakatsuka, S Teshigawara, K Murakami, T Terami, K Inoue, A Katayama, C Higuchi, M Watanabe, J Eguchi, H Makino. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 17 日
- ⑧ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9-Tim-3 経路の意義 勅使川原早苗、和田淳、神崎資子、江口潤、中司敦子、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 17 日
- ⑨ ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP 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、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 17 日
- ⑩ 糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 17 日
- ⑪ 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、小川大輔、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、片山晶博、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 18 日
- ⑫ メタボリックシンドロームにおける脂肪組織由来血清 miRNA の同定 樋口千草、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、江口潤、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 18 日
- ⑬ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase(PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、江口潤、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 18 日
- ⑭ Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. D Ogawa, J Eguchi, H Tachibana, C Sato-Horiguchi, T Hatanaka, A Nakatsuka, J Wada, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 22, 2013
- ⑮ Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. A Nakatsuka, J Wada, K Murakami, T Terami, J Eguchi, D Ogawa, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ⑯ ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) / CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. K Murakami, J Wada, J Eguchi, D Ogawa, T Terami, N Terami, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ⑰ 肥満において Pemt 欠損がもたらす脂肪肝炎とエピゲノム 中司敦子、和田淳、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、片山晶博、寺見隆宏、勅使川原早苗、村上和敏、江口潤、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会 (東京) 平成 25 年 10 月 12 日
- ⑱ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 GpnmB の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会 (東京) 平成 25 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

表 1 LecChip™ Ver.1 におけるレクチンのリストとその特異性

Lectin No.	Lectin	Origin	Reported specificity
1	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
2	PSA	<i>Pisum sativum</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
3	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
4	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
5	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>I-fucose-specific lectin</i>	Fuc α 1-6GlcNAc (core fucose)
6	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc
7	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
8	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
9	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
10	TJA-I	<i>Trichosanthes japonica</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
11	PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	tri/tetra-antennary complex-type N-glycan
12	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Gal β 1-4GlcNAc
13	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Gal β 1-4GlcNAc
14	PHAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	bi-antennary complex-type N-glycan with outer Gal and bisecting GlcNAc
15	DSA	<i>Datura stramonium</i>	(GlcNAc β 1-4) _n , Gal β 1-4GlcNAc
16	GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	agalactosylated tri/tetra antennary glycans, GlcNAc
17	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	High-Mannose, Man α 1-6Man
18	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man
19	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man
20	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
21	ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
22	TxLCI	<i>Tulipa gesneriana</i>	Man α 1-3(Man α 1-6)Man, bi- and tri-antennary complex-type N-glycan, GalNAc
23	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
24	TJA-II	<i>Trichosanthes japonica</i>	Fuc α 1-2Gal β 1- \rightarrow or GalNAc β 1- \rightarrow groups at their nonreducing terminals
25	EEL	<i>Euonymus europaeus</i>	blood group B antigen, Gal α 1-3Gal
26	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Gal β 1-3GalNAc
27	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	GlcNAc trimers/tetramers
28	STL	<i>Solanum tuberosum</i>	GlcNAc oligomers, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc
29	UDA	<i>Urtica dioica</i>	GlcNAc β 1-4GlcNAc, Mixture of Man ₅ to Man ₉
30	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	(GlcNAc β 1-4) _n
31	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc

32	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal β 1-3GalNAc
33	WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3(-6)GalNAc
34	ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Gal β 1-3GalNAc
35	MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
36	HPA	<i>Helix pomatia agglutinin</i>	α -linked terminal GalNAc
37	VVA	<i>Vicia villosa</i>	α -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
38	DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	blood group A antigen, GalNAc α 1-3GalNAc
39	SBA	<i>Glycine max</i>	α - or β -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
40	Calsepa	<i>Calystegia sepium</i>	Mannose, Maltose
41	PTL-I	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	α -linked terminal GalNAc
42	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-3(Sia α 2-6)GalNAc
43	WGA	<i>Triticum unlgaris</i>	chitin oligomers, Sia
44	GSL-I A4	<i>Griffonia simplicifolia Lectin I</i> <i>Isolectin A4</i>	α -linked GalNAc
45	GSL-I B4	<i>Griffonia simplicifolia Lectin I</i> <i>Isolectin B4</i>	α -linked Gal

These data were collected from lectin vendors and reports found by internet searches.

表2 糖尿病性腎症 A3G3 期の患者から得られた尿サンプルの liquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI*1	Score*2
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	36	11.04	3985
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	15	1.08	965
3	AMBP_HUMAN	Protein AMBP (alpha 1-microglobulin)	5	0.57	224
4	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	3	0.14	130
5	HEMO_HUMAN	Hemopexin	3	0.23	112
6	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	75
7	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	1	0.34	70
8	HPT_HUMAN	Haptoglobin	3	0.17	63
9	DTX3L_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	1	0.04	49
10	CLUS_HUMAN	Clusterin	1	0.07	39
11	SAP_HUMAN	Proactivator polypeptide	1	0.06	34
12	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	2	0.08	33
13	AFAM_HUMAN	Afamin	2	0.05	32
14	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	29
15	THRB_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	25
16	TRPC4_HUMAN	Short transient receptor potential channel 4	1	0.03	20
17	RABE1_HUMAN	Q15276	2	0.04	19
18	MARK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase MARK1	1	0.04	16

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amount

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

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology (p<0.05).

表 3 糖尿病性腎症A3G4期の患者から得られた尿サンプルのliquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

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

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amount

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

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

図 1. 糖尿病性腎症の各病期におけるレクチンアレイ解析

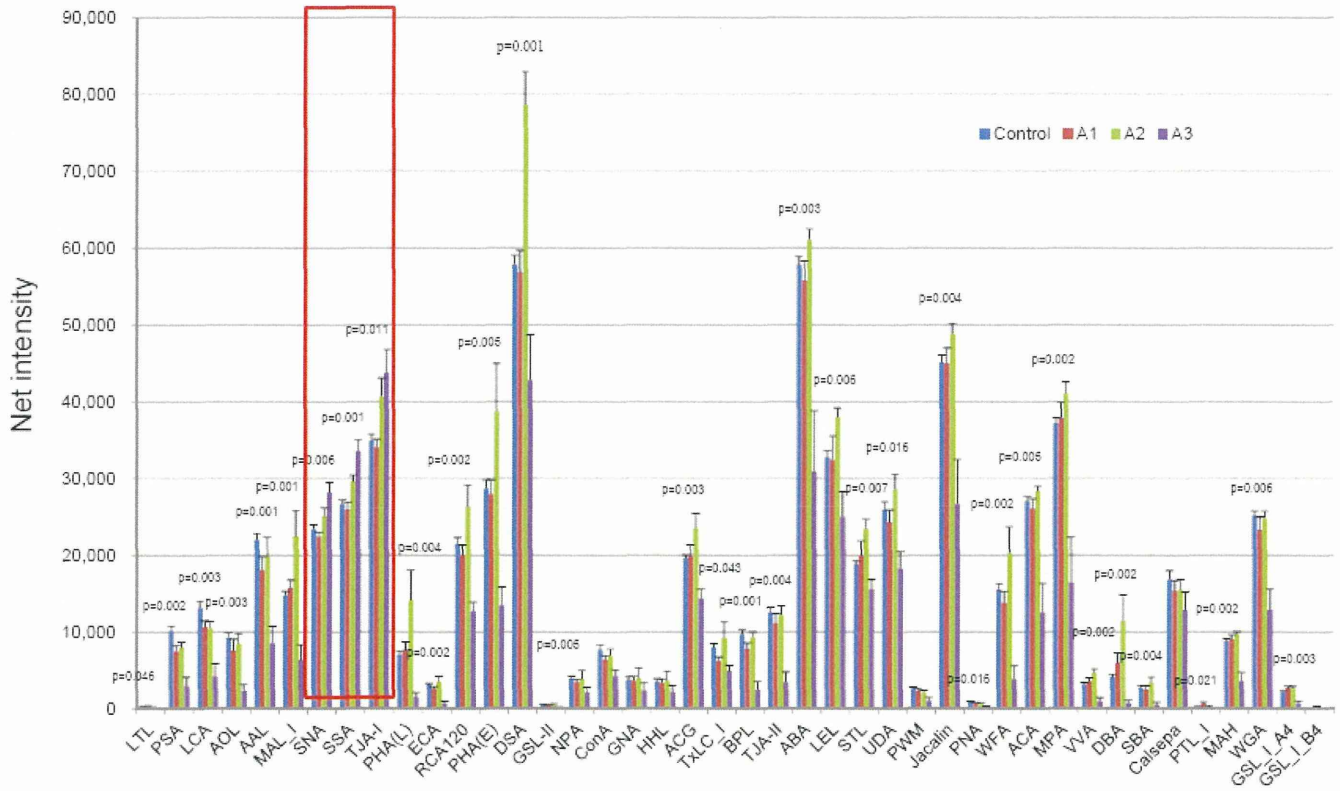
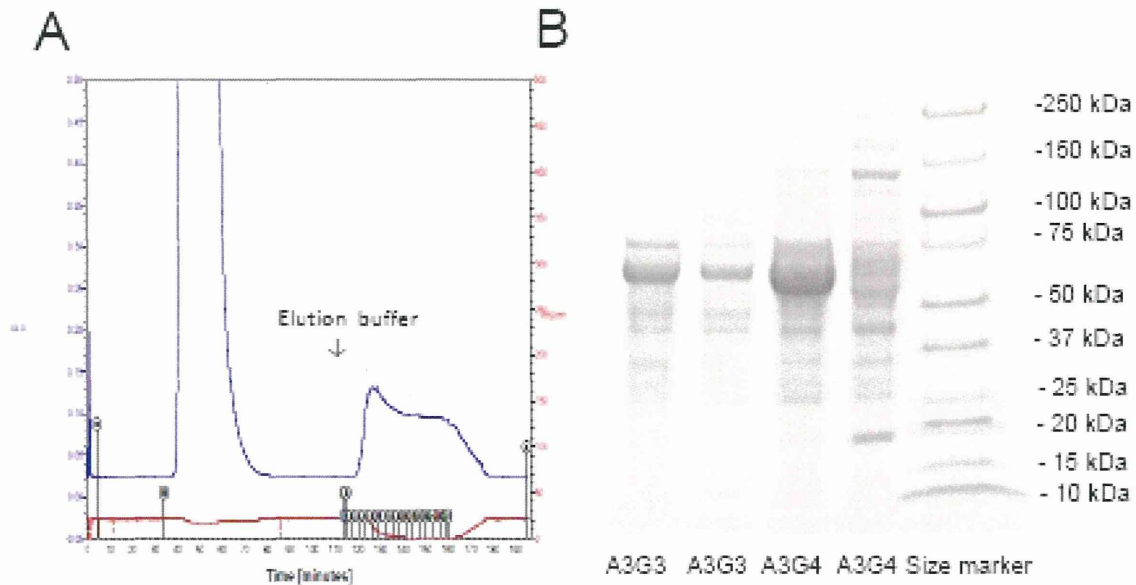


図 2 SSA レクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィー (A) と、精製された蛋白質の SDS-PAGE (B)



尿中バイオマーカーのELISAによる測定

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

研究分担者 勅使川原早苗・岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教

研究要旨

糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補として同定されたhaptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenを糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=36)、微量アルブミン尿期(n=25)、顕性蛋白尿期(n=24)の尿サンプルで測定した。測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aであった。 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aは既報でシアル酸蛋白質であることが報告されているため、これら3つの尿中マーカーについて糖尿病や腎症の臨床データとの横断的な比較検討を行った。 α 1-microglobulinは腎臓の間質マーカーとして保険収載されており、またorosomuroidは糖尿病性腎症の尿中マーカーとして報告されているが、尿中fetuin-AについてはELISAによる尿中濃度の検討はまだ報告がない。 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度は血清クレアチニン、尿素窒素、尿中アルブミン排泄量(ACR)と正の相関を示し、また血清アルブミン、HDL-コレステロール、eGFRと負の相関を示した。eGFR、尿中アルブミン排泄量(ACR)、HDL-コレステロールを独立変数として、尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量をそれぞれ従属変数として重回帰分析を施行した。尿中 α 1-microglobulin排泄量に関しては、eGFRと尿中微量アルブミン(ACR)が、尿中fetuin-A排泄量に関しては尿中アルブミン排泄量(ACR)が有意差をもって独立した説明変数であることが示された。さらに尿中orosomuroid排泄量に関しては、尿中アルブミン排泄量(ACR)とHDL-コレステロールが有意差をもって独立した説明変数であることが明らかとなった。微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量を比較した。ステップワイズ多項ロジスティック解析を施行した結果、微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中fetuin-A排泄量のみが採択された。

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）、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）、勅使川原早苗（岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教）

A. 研究目的

糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補として同定された haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogen を糖尿病性腎症患者の尿サンプルを用いて測定した。尿サンプルは糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=36)、微量アルブミン尿期(n=25)、顕性蛋白尿期(n=24)の患者から採取した。

B. 研究方法

尿サンプルを用いたELISA測定

N-抗血清ハプトグロビン、N-抗血清 α 2-マクログロブリン、N-抗血清セルロプラスミン、N-抗血清 α 2-アシッドグリコプロテイン（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）、アポA-Iオート・N「第一」（積水メディカル）、LZテスト栄研 α 1-M（栄研化学）、Human Fetuin-A ELISA (BioVender)、Human Total Angiotensinogen Assay Kit-IBL (IBL)を用いて尿中の濃度を測定し、クレアチニン補正を行うことによって検討した。

C. 研究結果

Haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenのうち測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A, angiotensinogen であった。 α 1-microglobulin,