

課題番号 : 26指104  
研究課題名 : 糖尿病腎症の新規尿蛋白質マーカーに基づく診断・治療法の開発  
主任研究者名 : 鎗木康志  
分担研究者名 :

キーワード : 糖尿病腎症、バイオマーカー、プロテオーム、メタボローム  
研究成果 :

糖尿病を含む代謝疾患では、長期間代謝異常が持続すると、動脈硬化性疾患や糖尿病に特徴的な微細な血管の機能及び形態異常による糖尿病性細小血管症が生じ、進行すると重篤な合併症をきたす。これらの糖尿病性細小血管症は重篤な合併症が進行するまで自覚症状を伴わないことが多く、日常診療の現場でその病期や予後・進行性などを診断可能なバイオマーカーが開発されればその意義は高い。我々は糖尿病腎症を含む糖尿病性血管合併症を早期に発見、あるいは予見し、効果的な治療法を開発することを目的としたバイオマーカー開発に取り組むことを目的に、国立国際医療研究センター、JR東京総合病院、富山大学附属病院に通院する2型糖尿病患者1029名より血清、尿検体の収集、ならびに附随する臨床データを取得した。本研究の目的の一つは、我々が先行研究にて行った2型糖尿病患者を対象とした血清、尿検体、ならびに附随する臨床データを用い、2型糖尿病、ならびに糖尿病性血管合併症を早期に発見、あるいは予見し、効果的な治療法の開発に貢献し得るバイオマーカーを探索することにある。糖尿病腎症患者の尿検体を用いた非標識定量プロテオミクス解析から、糖尿病腎症病期3~4期群、糖尿病腎症病期1期群間で発現差異の異なる96種類の尿中タンパク質を非標識定量プロテオーム解析により同定した。そのうちの9種の候補タンパク質の尿中濃度を、健康人対照群、糖尿病腎症1期群、糖尿病腎症2期群、糖尿病腎症病期3~4期群から構成される独立した集団にてMRM定量法により測定した。解析の結果、尿中アルブミン・クレアチニン比、ならびにeGFRの両者と有意な相関を示し糖尿病腎症の重症度と関連する尿中タンパク質3種を同定した。現在、糖尿病腎症の進展における当該尿中タンパク質濃度の推移を後述するコホート集団にて検討中である。

次に本研究にて開始した糖尿病腎症患者を対象とした前向きコホート研究では、本計画への参加に同意した先行研究参加者を中心に年1回の臨床検体および臨床情報を収集している。参加施設毎にコホート研究開始時期が異なっているものの、2016年9月末時点における検体収集数は、初年度(平成26年度)513検体、2年度(平成27年度)552検体であり、収集検体目標数の7割ほどの集団にてコホート研究を継続している[研究報告書(パワーポイント)1]。なお、現在のコホート研究に参加している2型糖尿病患者316名については先行の横断研究(平成20~24年度実施)においても臨床検体および臨床情報の提供を受けているため、腎症重症度の経時的な推移を追跡することが可能となった。横断研究実施時に糖尿病腎症1期であった2型糖尿病患者208名のうち平均追跡期間3年後の腎症進行患者数は38名(18.3%)であった[研究報告書(パワーポイント)2]。また、横断研究実施時に糖尿病腎症2期であった2型糖尿病患者は86名含まれ、そのうち、平均追跡期間3年後に腎症病期不変であった患者は52名(60.5%)、腎症進行患者は16名(18.6%)、腎症寛解患者は18名(20.9%)であった[研究報告書(パワーポイント)2]。最後に、上述の本研究にて同定した糖尿病腎症関連タンパク質1種について尿中濃度と糖尿病腎症の進行度との関連を後ろ向きに解析した。解析の結果、当該タンパク質濃度は糖尿病腎症の重症度と関連するだけでなく腎症の進行や寛解とも関連し、糖尿病性腎症の進行度を事前に予測しうる可能性が示された。

Subject No. : 26 指 104  
Title : Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetes and diabetic complications  
Researchers : Yasushi Kaburagi  
Key word : Diabetic kidney disease, Biomarkers, Proteome, Metabolome  
Abstract :

Over the last several years, type 2 diabetes mellitus (T2DM) has reached almost epidemic proportions all around the world. It is desirable to screen and treat glucose-intolerant individuals as early as possible, since, even before the onset of diabetes, microvasculature is gradually developed. Therefore, predictive biomarkers for T2DM and diabetic complications are urgently required, which may enable the prevention of onset and/or progression of T2DM and diabetic complications. Previously, we have performed serum proteomic analysis and found that serum SerpinA3 is associated with HbA1c. In the current study, we performed quantitative urinary proteomic analysis and identified 96 proteins were differentially excreted between the stage 3 diabetic nephropathy (DN) patients and stage 1 DN patients. Among them, 9 urinary proteins were validated to be differentially excreted between them using the independent sample set, and 3 proteins showed a significant correlation both with urinary albumin to creatinine ratio and eGFR. Moreover, one of the identified urinary protein (designated as protein A) was also differentially excreted between stages 3-5 CKD patients and stages 1-2 CKD patients.

We also have been conducting a prospective study to examine the association of the identified urinary proteins with the progression or regression of DN. In the first and second year of the prospective study, we have collected sera, urine and the corresponding clinical data from 513 and 552 T2DM patients, respectively. As we enrolled 1035 type 2 diabetic patients as cross-sectional study participants in 2008-2012, and 316 T2DM patients among them were enrolled also in the present prospective study, we could retrospectively analyze the changes of kidney function decline. The mean follow-up period was 2.4 years, and nephropathy developed in 18.3% of those who had normal urinary protein level at baseline (stage 1 DN) and in 18.6% of those who had microalbuminuria (stage 2 DN) at baseline. Furthermore, we retrospectively assessed the association of the urinary level of protein A with the progression of DN, and found that the urinary level of protein A was associated both with the progression and regression of DN, which may be useful to predict high-risk patients with DN.

# 1. 糖尿病腎症コホート研究における収集検体数、ならびに既存収集試料の概要

## 横断研究 (平成20~24年度)

#664:  
T2D, 142名

#664:  
T2D, 279名

#664:人間ドック科  
受診者, 651名

#664:  
T2D, 232名

#664:  
T2D, 203名

#664:  
T2D, 179名

(空欄)

## コホート研究

平成26年度      平成27年度      平成28~30年度

#G-001619-00:  
T2D, 142名

#G-001619-00:  
T2D, 140名

#G-001619-00:  
T2D, 231名

#G-001619-00:  
T2D, 130名

#G-001619-00:  
T2D, 135名

#G-001619-00:  
T2D, 186名

#G-001619-00:  
T2D, 101名

(#A-00252-00に  
移行)

(空欄)

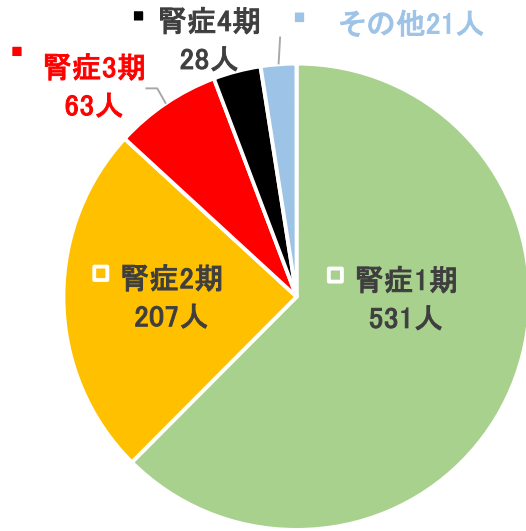
(#A-00252-00に  
移行)



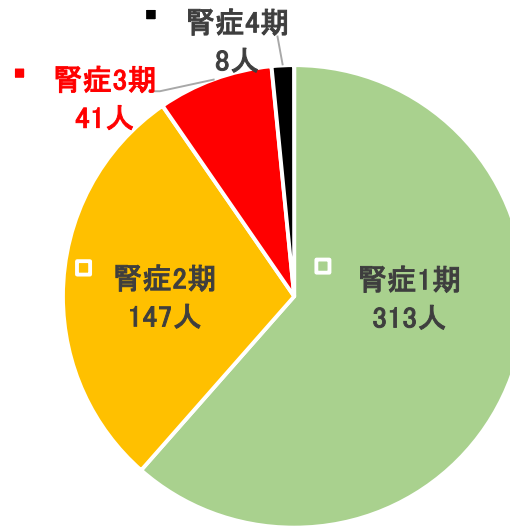
(#はNCGM承認番号、T2Dは2型糖尿病患者)

## 2. 収集年度別の糖尿病腎症病期内訳、ならびに糖尿病腎症患者の重症度推移

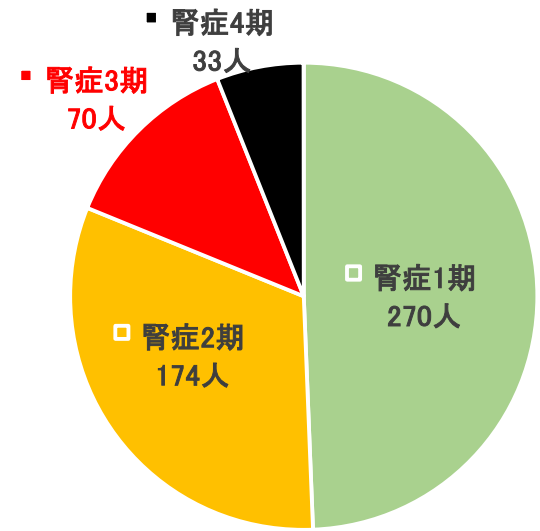
横断研究  
(850名、平成20～24年度)



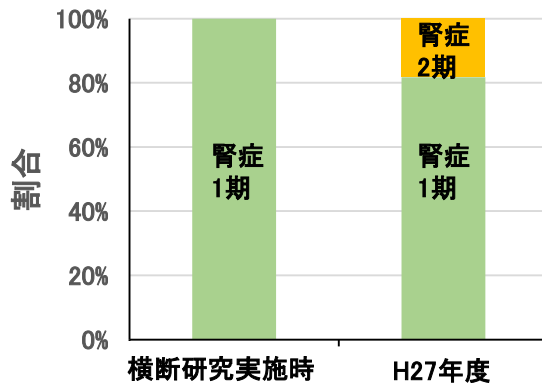
コホート研究  
(509名、平成26年度)



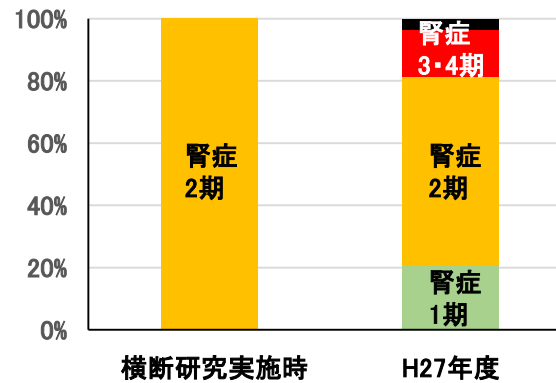
コホート研究  
(547名、平成27年度)



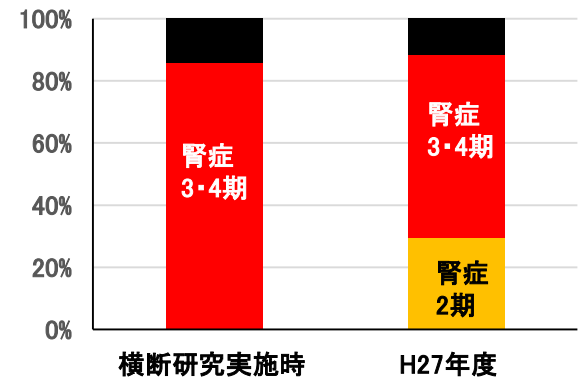
糖尿病腎症1期患者の  
重症度推移



糖尿病腎症2期患者の  
重症度推移



糖尿病腎症3～4期患者の  
重症度推移



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指104

研究課題名：糖尿病腎症の新規尿蛋白質マーカーに基づく診断・治療法の開発

主任研究者名： 鈴木康志

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch.	Sakai M, Tujimura-Hayakawa T, Yagi T, Yano H, Mitsushima M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Inoue H, Kido Y, Kasuga M, Matsumoto M.	Nat Commun.	7:13147.	2016
Crystal Structure of Human Leukocyte Cell-derived Chemotaxin 2 (LECT2) Reveals a Mechanistic Basis of Functional Evolution in a Mammalian Protein with an M23 Metalloendopeptidase Fold.	Zheng H, Miyakawa T, Sawano Y, Asano A, Okumura A, Yamagoe S, Tanokura M.	J Biol Chem.	291, 17133-17142.	2016
Reduced serum level of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is associated with the presence of diabetic retinopathy.	Okumura A, Unoki-Kubota H, Yoshida-Hata N, Yamamoto-Honda R, Yamashita S, Iwata M, Tobe K, Kajio H, Noda M, Katai N, Yamagoe S, Kaburagi Y.	Clin Chim Acta.	S0009-8981, 30440-30445.	2016
A novel angiogenic peptide, $\Delta$ ADT: A truncated adrenotensin peptide revealed by secretory peptidome analysis of human retinal pericytes.	Okumura A, Takahashi E, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y.	Biosci Trends.	10, 500-506.	2016
Proteomic analysis of serum biomarkers for pre-diabetes using the LEA rat, a spontaneous animal model of type 2 diabetes mellitus.	Takahashi E, Unoki-Kubota H, Shimizu Y, Okamura T, Iwata W, Kajio H, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Yamashita S, Tobe K, Okumura A, Matsumoto M, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y.	J Diabetes Investig.	印刷中	

研究発表及び特許取得報告について

プロテオミクスを用いた糖尿病研究—SERPINA3Kの発見を例に. 糖尿病研究の“いま”と治療の“これから”.	高橋 枝里、奥村 彰規、久保田 浩之、鏑木 康志.	実験医学増刊	201 (341)-205 (345)	2016
糖尿病合併症研究における質量分析装置の有用性.	鏑木 康志.	糖尿病合併症	31, 62-65	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Podocyte-Specific Deletion of Tubular Sclerosis Complex 2 Causes Focal segmental Glomerular Sclerosis and Progressive Renal Failure.	Unoki-Kubota H, Iwata W, Kato H, Shimizu A, Quaggin SE, Matsumoto M, Nangaku M, Kasuga M, Kaburagi Y.	American Diabetes Association 76th Scientific Sessions	New Orleans, LA.	June 10-14, 2016
糸球体上皮細胞におけるtuberous sclerosis complex 2の役割と腎機能への影響の解析.	岩田 和希子、久保田 浩之、松本 道宏、寺内 康夫、春日 雅人、鏑木 康志.	第53回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2016. 4. 15-16
新規鎖長ペプチドΔADTの網膜毛細血管内皮細胞に対する機能解析.	奥村 彰規、高橋 枝里、久保田 浩之、鏑木 康志.	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016. 5. 19-21
非標識定量プロテオーム解析による糖尿病腎症の尿中関連蛋白質探索.	高橋 枝里、久保田 浩之、本田 律子、志賀 智子、奥村 彰規、梶尾 裕、野田 光彦、鏑木 康志.	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014. 5. 22-24
Tuberous sclerosis complex 2の糸球体上皮細胞における役割の検討.	久保田 浩之、岩田 和希子、加藤 秀樹、清水 章、松本 道宏、南学 正臣、春日 雅人、鏑木 康志.	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014. 5. 22-24
プロテオミクスを用いた糖尿病, ならびに糖尿病性細小血管症診断マーカー探索研究の現状と課題.	鏑木 康志.	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014. 5. 22-24
非標識定量プロテオミクス法による糖尿病腎症関連尿蛋白質の同定	高橋 枝里、久保田 浩之、本田 律子、奥村 彰規、梶尾 裕、山下 滋雄、野田 光彦、鏑木 康志.	第31回日本糖尿病合併症学会	仙台	2016. 10. 7-8
糖尿病合併症研究における質量分析装置の有用性.	鏑木 康志.	第31回日本糖尿病合併症学会	仙台	2016. 10. 7-8

研究発表及び特許取得報告について

糸球体上皮細胞におけるmTORC1の役割と腎機能への影響の解析.	岩田 和希子、 久保田 浩之、 加藤 秀樹、清水 章、松本道宏、寺内 康夫、南学 正臣、春日 雅人、鏑木 康志.	第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	横浜	2017. 2. 10-11
----------------------------------	--	------------------------	----	----------------

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。