

課題番号 : 29指1023  
研究課題名 : 糖尿病性腎症の重症度や進行化を反映する病理学的指標の構築と関連バイオマーカーの探索  
主任研究者名 : 久保田 浩之  
分担研究者名 :  
キーワード : 糖尿病性腎症、RNA-seq、プロテオーム  
研究成果 :

糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎臓病患者では合併症の併発により平均余命が短く、腎症の早期発見と重症化予防法の開発は喫緊の課題である。糖尿病性腎症の重症化を早期に発見・予知するバイオマーカーに関する研究開発は全世界で精力的に行われているが、糖尿病性腎症の発症・進展における分子機序との関連が明確なバイオマーカーはほとんど報告されていない。そこで本申請課題では、センター病院泌尿器科にて泌尿器腫瘍と診断され腎摘出を受けた糖尿病性腎症患者、および非糖尿病患者を対象に非腫瘍部腎組織の病理学的解析を行い、糖尿病性腎症の重症度、ならびに進行化に関連する指標の構築と、その基盤となる病態解明を行うことを目的とする。

まず本研究への参加同意が得られた患者については、手術の際に腫瘍組織と同時に切除された正常組織を用いてパラフィン包埋 (FFPE) 標本、ならびに凍結標本を作製し、これらを用いて糖尿病性腎症の病理学的評価を行う。糖尿病性腎症の病理学的評価は「糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」[佐藤博, 鈴木芳樹, 北村博司 編集; 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(腎疾患実用化研究事業))) 糖尿病性腎症ならびに腎硬化症の診療水準向上と重症化防止にむけた調査・研究研究班 編、東京医学社、2015年]を参考に、Tervaert らが 2010 年に提唱した 5 分類に準拠した病理学的分類 (J Am Soc Nephrol. 2010;21(4):556-63)、基底膜 2 重化、polar vasculosis の有無をはじめとするパワーポイント資料 1(b) に記載の項目を主要評価項目とした。また、研究参加者のうち継続通院者については腎組織採取 1 年後、2 年後の生化学検査情報 [パワーポイント資料 1(a)] を糖尿病性腎症に関する予後情報として併せて収集する。

次に研究参加者より得られた腫瘍組織と同時に切除された正常腎組織を用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析、およびプロテオーム解析を開始するにあたり、糖尿病腎症モデルマウスを用いた解析手法の構築を行った。RNA-seq によるトランスクリプトーム解析のために糖尿病腎症モデルマウス、および対照マウス腎臓より得られた凍結組織標本を用いた。Zeiss 製レーザーマイクロダイセクションシステム PALM MicroBeam を用いて凍結組織標本より腎糸球体領域を切り出し total RNA を抽出した結果、腎糸球体 200~400 領域あたり 100~200 ng (RIN: 7.5 前後) の total RNA が得られた。得られた total RNA より RiboMinus Eukaryote System v2 (ThermoFischer Scientific 社)、および Low input RiboMinus Eukaryote System v2 (ThermoFischer Scientific 社) を用いて rRNA を除去し、Ion Total RNA-Seq Kit v2、および Ion Xpress RNA-Seq BC 01-16 Kit (ThermoFischer Scientific 社) により RNA シーケンス用ライブラリを作成後、Ion Proton システム (ThermoFischer Scientific 社) にて RNA シーケンスを実施した。引き続き FFPE 組織標本から調製した total RNA を用いた RNA シーケンスも行う予定である。一方、プロテオーム解析にむけた解析手法の構築では糖尿病腎症モデルマウス、および対照マウス腎臓より得られた FFPE 標本を用いた。上記トランスクリプトーム解析同様、レーザーマイクロダイセクションシステムにて腎皮質部分のみ切り出しプロテオーム解析に供した。腎皮質部分より得られた試料は極めて微量であるため、既報 (Nat Med. 2015; 21:407-13 and Proteomics 2015; 15) をもとに超高压抽出機 Barocycler 2320 を用いた腎組織からのタンパク質抽出条件を検討した結果、至適条件下では腎組織 1 mg より 500 種前後のタンパク質を同定することが可能となった。

Subject No. : 29 指 1023  
Title : Development of pathological and molecular markers for the progression of  
diabetic nephropathy  
Researchers : Hiroyuki Kubota  
Key word : Diabetic nephropathy, RNA-seq, Proteome  
Abstract :

Diabetes mellitus is a growing concern worldwide. The International Diabetic Foundation has predicted that the total number of diabetic people worldwide will rise to 642 million by 2040. Diabetic nephropathy (DN), one of the major microvascular complications of diabetes, has been a major cause of incident dialysis in Japan since 1998. DN is also a risk factor for cardiovascular disease, with a mortality rate more than 10-fold higher in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with end-stage renal disease than in T2DM patients without DN. 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 DN are urgently required, which may enable the prevention of onset and/or progression of DN.

The clinical and pathological manifestations of DN due to type 2 diabetes are diverse. A recent study revealed that advanced diabetic kidney lesions were incidentally detected even in normoalbuminuric cases (*Clin Exp Nephrol* 18:305-312, 2014). Recent studies also revealed that certain pathologic findings were useful predictive factors for renal functional decline in DN (*Diabetologia* 39:1569-76, 1996; *BMJ Open Diabetes Res Care* 2:e000029, 2014; *Diabetes Care* 36:3620-6, 2013; *Nephrol Dial Transplant* 33:138-148, 2017). In this study, we designed to perform omics analyses such as RNA-seq and proteome analyses using non-tumor kidney tissues obtained from the T2DM patients diagnosed as kidney cancer. The amount of sample available for omics analyses is suspected to be limited and thus we performed feasibility studies for RNA-seq and proteome analyses using small amounts of samples including biopsied kidney tissues, and established the experimental protocols.

# 1. 糖尿病性腎症の重症度・予後を予測する病理学的指標

	組織採取時	血液・尿採取時	1年後	2年後
年月日	○	○	○	○
性別	○	×	×	×
年齢	○	×	×	×
身長	○	×	×	×
体重	○	×	○	○
BMI	○	×	○	○
(a) HbA1c	○	○	○	○
空腹時血糖	×	○	○	○
網膜症有無	○	×	○	○
SBP/DBP	○	○	○	○
Cre	○	○	○	○
eGFR	○	○	○	○
尿アルブミン・クレアチニン比 (mg/g Cre)	○	○	○	○
尿蛋白量 (g/g Cre)	○	○	○	○
アルブミン尿 (g/g Cre)	○	○	○	○
(b) 腎病理 (I, Iia, Iib, III, IV)	○	×	×	×
基底膜2重化	○	×	×	×
Polar vasculosis有無	○	×	×	×
浸出性病変有無	○	×	×	×
球状硬化率 (%)	○	×	×	×
IFTA (1,2,3)	○	×	×	×
Interstitial inflammation (0, 1, 2)	○	×	×	×
Arteriolar hyalinosis (0,1,2)	○	×	×	×
採取組織内のarteryの有無 (有・無)	○	×	×	×
Arteriosclerosis (0,1,2)	○	×	×	×
心血管イベント	×	×	○	○
腎死	×	×	○	○
個体死	×	×	○	○

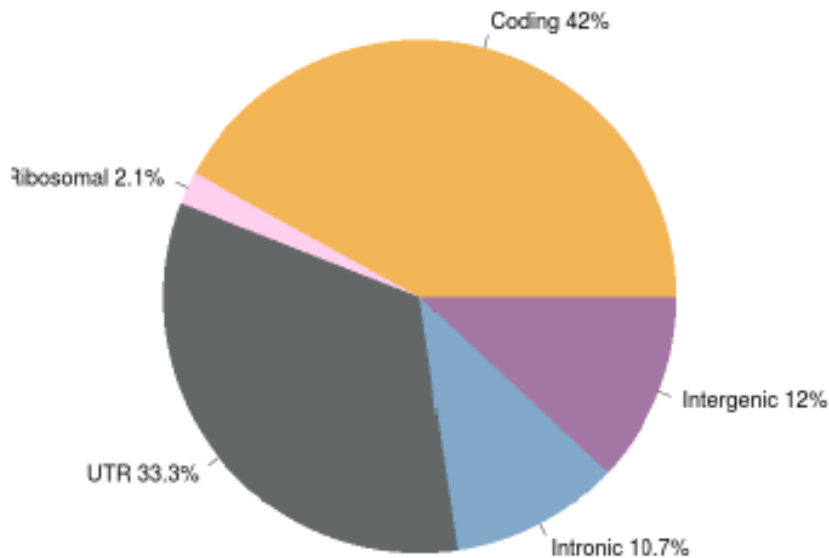
## 2. 凍結組織標本サンプルからの微量RNAを用いて、RNA-seq解析プロトコルを構築した

### Gene Mapping Summary

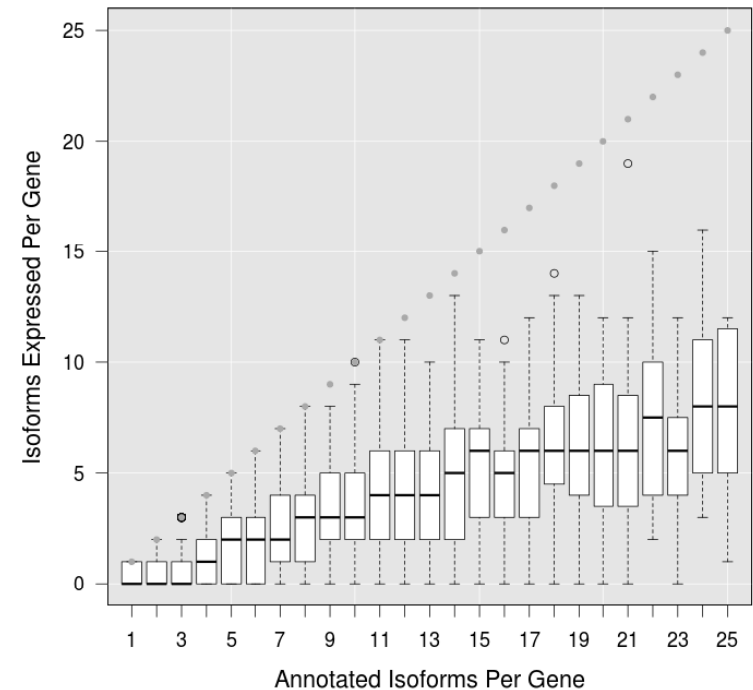
Reference genes	43,280
Reads mapped to genes	23,324,070
Genes with 1+ reads	28,669
Genes with 10+ reads	17,122
Genes with 100+ reads	11,423
Genes with 10,00+ reads	4,297
Genes with 10,000+ reads	276
Isoforms Annotated	129,970
Isoforms Detected	36,457

### Base Mapping Summary

Total base reads	3,770,274,287
Total aligned bases	3,443,648,075
Percent aligned bases	91.34%
Percent coding bases	41.97%
Percent UTR bases	33.28%
Percent ribosomal bases	2.08%
Percent intronic bases	10.71%
Percent intergenic bases	11.96%
Strand balance	0.5184



### Gene Isoform Expression



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1023

研究課題名：糖尿病性腎症の重症度や進行化を反映する病理学的指標の構築と関連バイオマーカーの探索

主任研究者名：久保田 浩之

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice.	Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S.	Biochem Biophys Rep.	12: 166-171	2017
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.	8: 661-671	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
2型糖尿病患者における血清可溶性受容体 sLR11濃度の検討	高橋 枝里、久保田 浩之、姜美子、梶尾 裕、岩田 和希子、奥村 彰規、野田 光彦、武城 英明、鏑木 康志	第32回日本糖尿病合併症学会	東京	2017. 10. 27-29
尿プロテオーム解析により同定されたafaminの糖尿病腎症進行予測マーカーとしての可能性	高橋 枝里、久保田 浩之、梶尾 裕、山下 滋雄、本田 律子、志賀 智子、野田 光彦、鏑木 康志	日本プロテオーム学会2017年大会 (JHUP0第15回大会)	大阪	2017. 7. 26-28

研究発表及び特許取得報告について

Urinary afamin levels predict decline of renal function in patients with type 2 diabetes	Takahashi E, Unoki-Kubota H, Okumura A, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Kajio H, Yamashita S, Noda M, Kaburagi Y	American Diabetes Association 77th Scientific Sessions	米国、サンディエゴ	2017. 6. 9-14
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、山下 滋雄、梶尾 裕、野田 光彦、鍋木 康志	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017. 5. 18-20
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、鍋木 康志	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017. 5. 18-20

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。