

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700557

研究課題名（和文） 2型糖尿病の進展および合併症における血漿プロテオーム解析

研究課題名（英文） Plasma Proteome analysis of KK-Ay mice developing type-2 diabetes

研究代表者

加藤 元士（KATO MOTOSHI）

山口県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：60336930

研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病モデルである KK-Ay マウスを用い、週齢を追うごとに症状が悪化する病態のステージ別に血漿プロテオーム解析を行うことにより、糖尿病およびその合併症に特異的なタンパク質を同定した。その結果、病態の進展に伴い Apolipoprotein E、Fibrinogen gamma chainをはじめ、特異的に変動するいくつかの血漿タンパク質候補を同定した。本研究にて同定されたタンパク質は、糖尿病の発症、進展および合併症を予測する指標となり、早期診断および治療に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

By performing plasma proteome analysis of KK-Ay mice, which are models of type 2 diabetes, we identified proteins that are specific to diabetes and its complications. We analyzed the mice at each stage of the pathological condition of the disease, wherein the symptoms worsened as the age (in weeks) of the mice increased. We thus identified several candidate plasma proteins that changed specifically with the progression of the disease. These proteins included Apolipoprotein E and the Fibrinogen gamma chain. The proteins identified in this study are indicators predicting the onset, development, and complications of diabetes, and are believed to contribute to early diagnosis and treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：糖尿病、血漿、プロテオーム解析、KK-Ay マウス

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において糖尿病をはじめとする生活習慣病の克服は、21世紀医学の最重要課題である。我が国の糖尿病患者数は急激に増加しており、平成18年 国民健康・栄養調査結果での糖尿病が強く疑われる人は約820万人となっている。さらに、糖尿病の可能性が否定できない人を含めると総数は約1870万人と推定され、今や糖尿病は国民病の1つとして認知されている。さらに、糖尿病は網膜症、腎症および神経障害をはじめ、さまざまな合併症を発症し、失明や人工透析に陥る患者も多くみられる。そして、結果として個人の生活や食事、社会活動等に極めて大きな制約を与え、医療費も膨大なものとなっている。これらのことより、糖尿病の発症の予測、また糖尿病の進展および合併症において、より早期に予測することができるバイオマーカーを発見することは、糖尿病の診断や治療において重要であると考えられる。

現在、ゲノムの解読が終了し、ゲノム情報に基づく遺伝子発現解析などが行われている。しかし、糖尿病などの生活習慣病に代表されるような多因子疾患では、遺伝要因と環境要因が複雑に関連するため、その原因となる遺伝子を発見しただけでは直接的な治療法になかなか結びつかない。

そこで、本研究のようにタンパク質を網羅的に解析する、いわゆるプロテオーム解析が重視されるようになり、近年さまざまな分野で研究されている。

### 2. 研究の目的

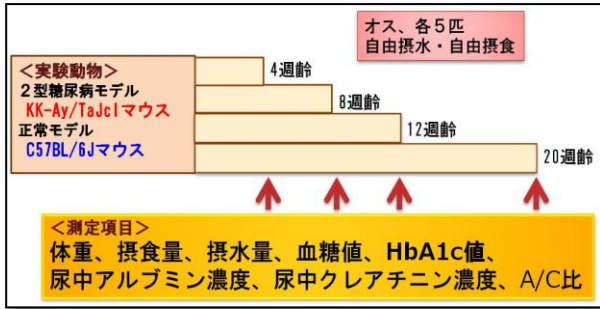
本研究では、2型糖尿病の発症・進展そして糖尿病性腎症の症状が週齢を追うごとに悪化するKK-Ay/TaJc1マウスの血漿を用いた。そして、糖尿病の病期のステージ別にプロテオーム解析を行い、タンパク質を網羅的に解析した。これにより糖尿病の発症、進展および、糖尿病性腎症に対する早期診断・治療に役立つ新たなバイオマーカーを発見し、臨床へ応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究に使用する動物は、2型糖尿病モデルとして肥満、高血糖および高インスリン血症を示すKK-Ayマウス（雄）を、コントロールとして正常モデルマウスのC57BL/6Jマウス（雄）を日本クレアより購入して使用した。そして、「動物実験の適切な実施に向けたガイドライン」（2006年6月1日、日本学術会議）に従い、山口県立大学生命倫理委員会の承認を得た後、本学動物室（午前8時から12時間の明暗サイクル）で個別ケージにて飼育した。飲水は上水道水を自由に与え、飼料は自由摂食させた。

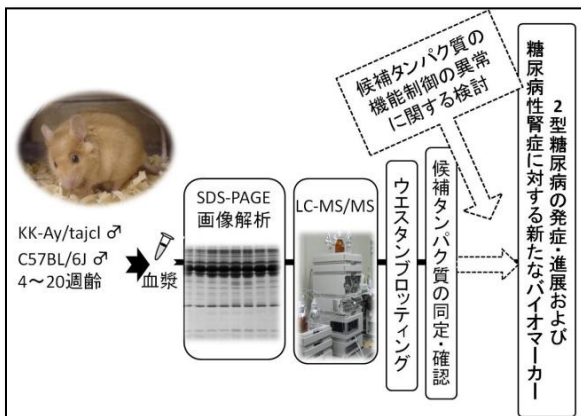
血漿を用いた経時的なプロテオーム解析を行うため、KK-AyマウスおよびC57BL/6Jマウスの4、8、12及び20週齢時に採血および採尿を行った。そして、各週齢の体重、摂食量、摂水量、血糖値、HbA1c値、尿中アルブミン値、尿中クレアチニン値、A/C比を測定した（図1）。

図 1



各週齢の血漿を用いて病態のステージ別に SDS-PAGE および LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析により、糖尿病の進展を予測する血漿タンパク質候補を同定した。さらに、そのタンパク質の同定結果を Western Blot 法により確認した (図 2)。

図 2



#### 4. 研究成果

##### (1)

KK-Ay マウスの血糖値 (図 3) および HbA1c 値 (図 4) は、週齢が増すごとに上昇を認めた。また、図には示していないが、体重、摂食量、摂水量においても、週齢が増すごとに増加を認めた。

以上のことより、KK-Ay マウスは糖尿病発症や進展の研究モデルとして有用であることを確認した。

図 3

### 血糖値

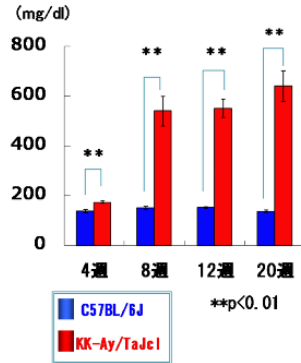
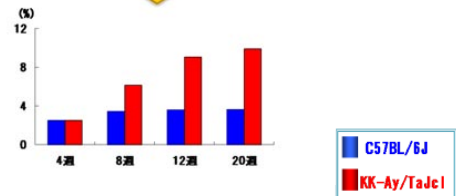


図 4

### HbA1c

週齢	C57BL/6J (n=5)					KK-Ay/TaJcl (n=5)				
4週	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
8週	3.4	3.3	3.4	3.6	3.6	5.1	6.4	6.2	6.4	6.7
12週	3.7	3.6	3.5	3.6	3.6	8.4	8	8.7	10.8	9.4
20週	3.5	3.7	3.7	3.5	3.7	9.3	10.3	10	10.8	9.1



##### (2)

KK-Ay マウスの尿中アルブミン値 (図 5) は週齢が増すごとに増加、尿中クレアチニン (図 6) は減少を認めた。また、図には示していないが、A/C 比は週齢が増すごとに増加を認めた。

以上、KK-Ay マウスは、糖尿病発症や進展の研究モデルとしてだけでなく、糖尿病性腎症の発症モデルとしても有用性が示唆された。

図 5

### 尿中アルブミン

週齢	C57BL/6J (n=5)					KK-Ay/TaJcl (n=5)				
4週	11.2	8.9	15.6	12.2	8.9	20.8	28.9	37.9	34.1	29.4
8週	<5	<5	<5	<5	<5	48.2	140	143	145	143
12週	<5	7.6	<5	<5	<5	107	134	144	143	154
20週	<5	<5	<5	<5	<5	136	151	131	145	133

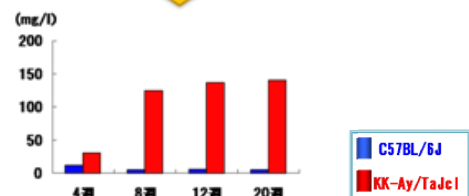
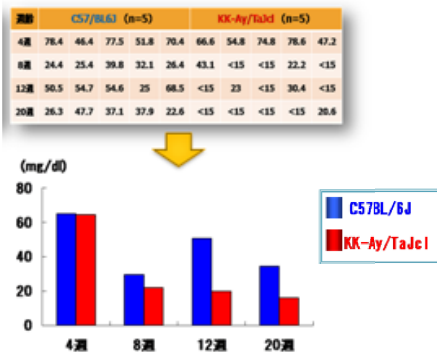


図 6

尿中クレアチニン



(3)

図 7 に示すように、4、8、12 及び 20 週齢の血漿を用いて病態のステージ別に SDS-PAGE を行い、たんぱく質を分離した。そして、LC-MS/MS により、すべてのタンパク質バンドを同定した (図 8)。

KK-Ay マウスの血漿プロテオーム解析により、病態の進展に伴い変動する候補タンパク質として、

- Complement C3
- Epidermal growth factor receptor
- Serum albumin
- Alpha-1-antitrypsin 1-1
- Alpha-1-antitrypsin 1-4
- Fibrinogen gamma chain
- Vitamin D-binding protein
- Apolipoprotein E

が同定された (図 9)。そのタンパク質の同定結果を Western Blot 法により確認した。

以上、本研究にて同定されたタンパク質は、糖尿病の発症、進展および合併症を予測する指標となり、早期診断および治療に寄与するものと期待される。

図 7

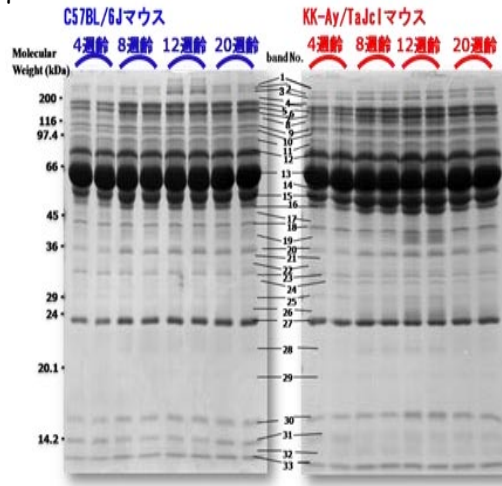
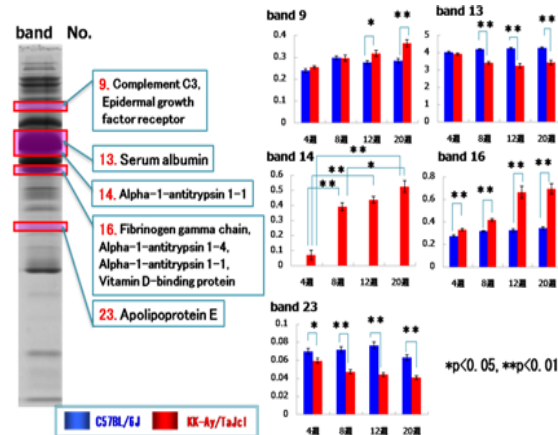


図 8

band No.	C57BL/6J 4週齢	C57BL/6J 20週齢	KK-Ay/Tajcl 4週齢	KK-Ay/Tajcl 20週齢
1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP
2	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
3	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
4	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
5	Macroglobulin 1, Alpha 2-macroglobulin	Macroglobulin 1, Alpha 2-macroglobulin	Macroglobulin 1, Alpha 2-macroglobulin	Macroglobulin 1, Alpha 2-macroglobulin
6	Complement factor B	Complement factor B	Complement factor B	Complement factor B
7	Complement factor B	Complement factor B	Complement factor B	Complement factor B
8	Complement C3, Epidermal growth factor receptor	Complement C3, Epidermal growth factor receptor	Complement C3, Epidermal growth factor receptor	Complement C3, Epidermal growth factor receptor
9	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen
10	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen	Complement factor B, Phenoxigen
11	Daloidin	Daloidin	Daloidin	Daloidin
12	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP
13	Serum albumin	Serum albumin	Serum albumin	Serum albumin
14	Alpha 1-antitrypsin 1-4	Alpha 1-antitrypsin 1-4	Alpha 1-antitrypsin 1-1	Alpha 1-antitrypsin 1-1
15	Fibrinogen gamma chain, Alpha 1-antitrypsin 1-4, Vitamin D-binding protein	Fibrinogen gamma chain, Alpha 1-antitrypsin 1-4, Vitamin D-binding protein	Fibrinogen gamma chain, Alpha 1-antitrypsin 1-1, Vitamin D-binding protein	Fibrinogen gamma chain, Alpha 1-antitrypsin 1-1, Vitamin D-binding protein
17	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP
18	Apolipoprotein A-M	Apolipoprotein A-M	Apolipoprotein A-M	Apolipoprotein A-M
19	Prothymosin	Prothymosin	Prothymosin	Prothymosin
20	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin
21	Chitinase	Chitinase	Chitinase	Chitinase
22	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin	Alpha 2-macroglobulin
23	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E
24	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E
25	Complement C1a subcomponent subunit B	Complement C1a subcomponent subunit B	Complement C1a subcomponent subunit B	Complement C1a subcomponent subunit B
26	Macromolecular inhibitor	Macromolecular inhibitor	Macromolecular inhibitor	Macromolecular inhibitor
27	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1
28	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1
29	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1	Apolipoprotein A-1
30	Transferrin	Transferrin	Transferrin	Transferrin
31	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, Prolysin AMBP
32	Apolipoprotein C-2	Apolipoprotein C-2	Apolipoprotein C-2	Apolipoprotein C-2
33	Apolipoprotein A-2	Apolipoprotein A-2	Apolipoprotein A-2	Apolipoprotein A-2

図 9



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

加藤元土、木村有香、長坂祐二、田中寿幸、

張秀蓮、藏満保宏、中村和行、2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスの血漿プロテオーム解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 元士 (KATO MOTOSHI)  
山口県立大学・看護栄養学部・助教  
研究者番号：60336930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし