

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591198

研究課題名(和文)糖尿病性腎症の新規バイオマーカー開発を目指した、単離糸球体のプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteome analysis of isolated glomeruli of diabetic nephropathy

研究代表者

石村 栄治(Ishimura, Eiji)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20145775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症の診断・治療において腎組織特異的な新規マーカーの開発が望まれている。我々は、糖尿病剖検患者の糸球体(腎臓の主要構成成分)を単離し、糸球体に含まれる蛋白質を解析(プロテオーム解析)し、ネフロネクチンの発現増加を同定した。本研究では、ネフロネクチンは糖尿病糸球体に広く発現し、糸球体硬化度(障害度)と関連があること、さらに糖尿病性腎症に特異的であることなどを明らかにした。ネフロネクチンは糖尿病性腎症に関わる新規蛋白質である可能性がある。また、尿中ならびに血中ネフロネクチン濃度の検討も行っているが、現時点で有意な結果は得られていない。今後、症例の蓄積、測定方法の工夫などが必要である。

研究成果の概要(英文)：Proteome analysis is a new technology which can be used to identify disease-specific proteins. We performed proteome analysis of isolate diabetic glomeruli in human autopsy cases to identify new molecules which are related to diabetic nephropathy. By proteosome analysis, nephronectin, which functions as assembly of extracellular matrix, was demonstrated to be up-regulated in diabetic glomeruli. Immunohistochemistry of renal biopsy specimen revealed that nephronectin was highly expressed in mesangial expansion and nodular glomerulosclerosis of diabetic patients, but not in the glomeruli of non-diabetic patients. Furthermore, there was a significant positive correlation between glomerular sclerosis index and percentages of nephronectin-positive glomeruli of diabetic patients. Our results suggest that nephronectin may play an important role in the progression of diabetic nephropathy. Serum and urine concentration of nephronectin is currently performed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 糸球体硬化症 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我が国における新規透析導入患者数は年間約3.8万人であり、糖尿病性腎症は、1998年にそれまで1位であった慢性糸球体腎炎を抜いて透析導入原疾患の第1位となり、全体の44.2%を占めるまでに至った。また、日本透析学会の推計では、今後更なる糖尿病性腎症による透析患者数の増加が予想されている(透析会誌2006:39(7):1237-1244)。新規透析患者数の減少には、糖尿病性腎症の進行抑制が不可欠であり、それには糸球体組織変化に応じたバイオマーカーが必要となる。

2. 研究の目的

現在、尿中微量アルブミン尿が早期バイオマーカーとして用いられているが、微量アルブミン尿出現前から、糸球体に軽度のびまん性病変が存在するケースが多々あり問題となっている。新規透析患者数の減少には、糖尿病性腎症の進行抑制、ならびに糖尿病性腎症の早期発見・早期治療が必要であるとされ、そのためには糸球体組織変化に対応した新規バイオマーカーの開発が切望されている。本研究では糖尿病患者の糸球体を用いたプロテオミクスを行い、そのバイオマーカーとしての有用性を検討することが目的である。

3. 研究の方法

以下の項目にそれぞれ、研究方法を記載した。

4. 研究成果

【動物モデルでの単離糸球体を用いたプロテオミクス】

27週齢(早期腎症期)、38週齢(顕性腎症前期)の自然発症2型糖尿病モデルのOLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラット、コントロールのLETO(Long-Evans Tokushima Otsuka)ラットの糸球体をsieving

法にて単離し、QSTAR Elite LC-MS/MS(AB Sciex, Foster City, Calif, USA)を用いてプロテオミクスを行った。27週齢で192種類、38週齢で218種類の蛋白質を同定した。両週齢で共通して発現していた蛋白質は細胞骨格の維持に関わるものが27個と最も多く、ストレスファイバー関連蛋白質、アクチンの重合に関わる蛋白質、中間系フィラメントや微小管関連蛋白質などの発現変動を認めた。その内、アダプター蛋白として働くSorbin and SH3 domain containing(SORBS2)が両週齢においてOLETF群と比較してOLETF群で高度に発現していた(27週齢:1.49倍、32週齢1.97倍)。免疫組織学的染色でSORBS2が足突起に発現していることを同定し、さらにRT-PCR法にてmRNAレベルでも糖尿病糸球体内に発現していることを同定した。しかし、本研究のsieving法では、完全に尿細管成分を除去することは困難であり、純度の高い糖尿病糸球体を用いたプロテオミクスではないという問題が指摘された。【Exp Diabetes Res. 2011;2011:979354】

【糖尿病性腎症患者剖検例における単離糸球体を用いたプロテオミクス】

動物モデルでは、糸球体組織からの蛋白回収が思うよう進まず、また上述のごとく糸球体組織の純度も高くないため、糖尿病患者の腎生検試料からレーザーマイクロダイセクション法にて純度の高い糸球体を回収する計画をたてた。しかし、予備検討にて、プロテオミクスには100万 μm^2 (約1000個)の糸球体が必要であることが判明した。そこで生体試料を用いるのは困難と判断し、糸球体試料が豊富な剖検組織に注目した。近年、Liquid Tissues 試薬の開発により、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織から蛋白抽出を行いプロテオミクスすることが可能となった。そこで本研究では、糸球体組織を

反映するバイオマーカー候補蛋白質の同定や、糖尿病性腎症の病態の解明のため、糖尿病性腎症患者剖検症例の FFPE 腎組織を用いたプロテオミクスを行うことにした。

対象は 1997 年以降、大阪市立大学医学部付属病院にて病理解剖を行った、糖尿病性腎症患者剖検例 10 例、および非糖尿病患者剖検例 10 例である。各々の症例から 10 μ m の厚さで DIRECTOR™ スライド (Expression Pathology, Gaithersburg, MD, USA) を用いて切片を作成し、Zeiss PALM® MB4 Microdissection System (Zeiss, Munich, Germany) によるレーザーマイクロダイセクション法にて各症例 100 個の糸球体 (各群 1000 個) を単離した。その後、Liquid Tissues 試薬を用いてタンパクの回収を行い、iTRAQ ラベリング法 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) を用い、糖尿病性腎症群・非糖尿病群間の糸球体における蛋白質の発現を定量比較した。

両群間において発現の変動していた 100 個の蛋白質を Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Mountain View, CA) で詳細に検討し、31 個の腎・泌尿器関連蛋白質を同定した。それらの蛋白質のうち、糖尿病性腎症と関連の知られていないものに関して、免疫組織学染色にて糸球体での発現を確認した。その結果、細胞外基質の増加に関わるネフロネクチンが糖尿病性腎症患者の糸球体に高発現しており (1.25 倍、 $p=0.0006$)、免疫染色 (Trans Genic Inc. Kumamoto, Japan) ではメサンギウム基質の増加部位・結節性病変に局在していることを確認した。以上の結果からネフロネクチンが糖尿病性腎症糸球体で発現する新規蛋白質

であることを同定した。

なお、本結果では上述の SORBS2 は同定されなかったが、ネフロネクチン以外に、既に糖尿病性腎症との関連が知られているアポリポプロテイン E (1.68 倍、 $p=0.01$)、

型コラーゲン (1.24 倍、 $p=0.0006$) の糖尿病性腎症糸球体での発現増加や、糸球体細胞骨格の維持に関わるポドシン (0.7 倍、 $p=0.0055$ 倍)・アクチニン (0.81 倍、 $p=0.0001$ 倍) などの発現低下を認めており、本研究が糖尿病性腎症糸球体の組織変化を適切に反映していると考えられた。)

【Nephrol Dial Transplant. 2012 May;27(5):1889-97】

【ネフロネクチンの発現度と糸球体硬化度の検討】

次に、ネフロネクチンの糖尿病糸球体における発現度と糸球体効果度を検討した。対象は 1997 年から大阪市立大学医学部付属病院にて病理解剖の施行された 93 例の糖尿病患者剖検例 (腎症有り 45 例、腎症無し 48 例) および、上述のプロテオミクスで用いた非糖尿病患者 10 例である。糸球体硬化度の評価は、各糸球体を 0 点：ほとんど変化のない糸球体。1 点：一部にメサンギウム増加を認める糸球体。2 点：全体にメサンギウム基質の増加を認める糸球体。3 点：メサンギウム基質の増加が著しく血管腔の狭小化を認める糸球体。4 点：全硬化糸球体として評価し、各症例につき 100 個の糸球体を観察し、その期待値を糸球体硬化度とした。また、ネフロネクチン発現度は、糸球体面積におけるネフロネクチン陽性面積に応じて 0 点：ネフロネクチン陽性面積 0% の糸球体、1 点：ネフロネクチン陽性面積 1 - 25% の糸球体、2 点：ネフロネクチン陽性面積 26 - 50% の糸球体、3 点：ネフロネクチン陽性面積 51 - 75% の糸球体、4 点：ネフロネクチン陽性面積 76 -

100%の糸球体として、100個の糸球体を観察してその合計をネフロネクチン陽性度(%)とした。

結果、糖尿病性腎症有り群の糸球体では糖尿病性腎症が無い群の糸球体に比べて、ネフロネクチンは高度に発現していた(腎症有り: $32.1\pm 31.5\%$ vs. 腎症無し: $4.14\pm 5.65\%$, $p<0.0001$)。さらにネフロネクチン陽性糸球体の割合と糸球体硬化度との間に正の相関関係が見られ($r=0.881$, $p<0.0001$, $n=93$)。一方、糖尿病性腎症が無い糖尿病群と、非糖尿病群の比較では、糸球体硬化度に有意差が無いにも関わらず(腎症無し: 0.44 ± 0.35 vs. 非糖尿病群: 0.25 ± 0.17 , $p=0.073$)、ネフロネクチン陽性度には有意差を認めた(腎症無し: 4.14 ± 5.65 vs. 非糖尿病群: 0.54 ± 0.36 , $p<0.0001$)。以上の結果からネフロネクチンは糖尿病性腎症早期から糖尿病糸球体に発現し、糖尿病性腎症の組織学的な進行と関連の深いタンパク質である可能性が高いことが示された。【Nephrol Dial Transplant. 2012 May;27(5):1889-97】

【ネフロネクチンの糖尿病性腎症に対する特異性の検討】

糸球体におけるネフロネクチンの発現が糖尿病に特異的であるか否かを検討するために、2009年から2011年の間に大阪市立大学付属病院腎臓科内科に入院した、様々な腎疾患患者190例に対して、腎生検組織を用いて糸球体のネフロネクチン陽性面積をAperio Scan Scope scanner (Aperio, Vista, CA), で客観的に評価し、比較検討した。

糖尿病性腎症におけるネフロネクチン陽性面積 $15\pm 4.7\%$ ($n=18$) は、他の腎疾患におけるネフロネクチン陽性面積より有意に高値であった。【IgA腎症; $4.8\pm 2.9\%$ ($n=46$)、膜性腎症; $6.0\pm 3.9\%$ ($n=30$)、微小

変化群; $4.1\pm 2.0\%$ ($n=28$)、膜性増殖性糸球体腎炎; $7.0\pm 5.7\%$ ($n=14$)、ループス腎炎; $4.0\pm 3.0\%$ ($n=11$)、急速進行性糸球体腎炎; $7.6\pm 3.4\%$ ($n=9$)、巣状糸球体硬化症; $4.5\pm 3.3\%$ ($n=9$)、高血圧性腎硬化症; $8.1\pm 4.7\%$ ($n=8$)、その他; $4.7\pm 2.0\%$ ($n=17$), $p<0.05$]。また、重回帰分析において空腹時血糖がネフロネクチン陽性面積の増加に関連していることを確認し($r=0.23$, $p<0.001$)、ネフロネクチンの免疫組織学的染色は組織学的な糖尿病性腎症診断に有用であり、糖尿病と強い関連のある蛋白質である事を示した。【Nephron Clin Pract. 2012;122(3-4):114-21】

【糖尿病患者における血中および尿中ネフロネクチン濃度の検討】

これまでの結果から、ネフロネクチンが糖尿病性腎症糸球体に特異的に発現し、糖尿病性腎症の組織変化と関連する蛋白質である可能性が示された。次に、市販されているネフロネクチン EKISA kit (Uscn, Life Science Inc) を用いて、そのバイオマーカーとしての有用性の検討を行った。

2型糖尿病患者40例(CKD stage1-5各8例)での血中ネフロネクチン濃度の検討では、40例中18例(45%)が検出範囲(0.156ng/ml)以下であった。測定範囲の22例の血中ネフロネクチン濃度は $0.408\pm 0.26\text{ng/ml}$ であった。測定範囲内のCKD stageの内訳は、stage1:4例、stage2:5例、stage3:5例、stage4:4例、stage5:4例であり、CKD stageと血中ネフロネクチンの関連は認められなかった。尿中ネフロネクチンに関しては同じ kit (Uscn, Life Science Inc) を用いて、糖

尿病患者 16 例と、非糖尿病患者 4 例の合計 20 例を対象に測定してみたところ検出範囲内であったのは糖尿病 10 例および非糖尿病 3 例であり、その濃度はそれぞれ、2.48ng/ml、1.66ng/ml であった。なお、本キットを用いた血中および尿中ネフロネクチンの検討は希釈条件や測定者を変えて合計 4 回ずつ施行したがいずれも同様の結果であった。これらの結果から、本キットを用いたネフロネクチン濃度測定は評価困難であると判断した。

次に ELISA kit をコスモバイオ社の ELISA kit 変更して検討した。対象は糖尿病患者 60 例、非糖尿病患者 13 例である。血中濃度が測定感度内であったのは糖尿病患者 22 例、非糖尿病患者 1 例、尿中濃度が感度内であったのは糖尿病患者 36 例、非糖尿病患者 8 例であった。なお本検討は測定者を変えて 2 回ずつ施行したが同様の結果であった。以上の結果から糖尿病患者における既存のネフロネクチン ELISA kit における測定感度は低いことが判明し、現時点で糖尿病性腎症におけるネフロネクチンの濃度測定の有用性は明かではない。現在新規キットの検索、血清・尿採取および保存方法の工夫、測定方法の変更などを検討している。

【考察】

本研究から剖検症例の FFPE 組織を用いたプロテオミクスが有用であることが示された。この方法は腎組織のみならず、他臓器でも応用可能で、剖検例の FFPE 組織を用いた新たな研究方法が開発されたと考える。

糖尿病性腎症剖検例の単離糸球体を用いたプロテオミクスと、その後の腎生検試料を用いたネフロネクチンの発現の検討から、ネフロネクチンが糖尿病性腎症腎症糸球体に

特異的に発現し、糖尿病性腎症の組織変化と関連する蛋白質である可能性が示された。今後、ネフロネクチンの糖尿病性腎症における機能解析が必要である。

ネフロネクチンのバイオマーカーとしての有用性の検討では、市販の kit では測定感度は低く、有用性は低いといわざるを得ない。ネフロネクチンは糖尿病性腎症のスクリーニングとしての感度は低いが、組織変化を反映するバイオマーカーとしての可能性は残されており。当院での症例数は多く無いが、糖尿病性腎症と腎生検で診断した症例に対して、ネフロネクチンの血中および尿中濃度と、ネフロネクチン陽性面積・糸球体効果を検討していく予定である。また測定に際して、今後、糖尿病性腎症症例の血液・尿サンプルの回収を継続しつつ、測定方法の変更が必要である。現在は採取後一度凍結したサンプルで解析しているが、凍結解凍が測定に影響を及ぼす可能性があり、サンプル回収後直ちに測定するなど工夫する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Fukumoto S, Yamano S, Wei M, Emoto M, Wanibuchi H, Inaba M: Nephronectin expression in glomeruli of renal biopsy specimens from various kidney diseases: Nephronectin is expressed in the mesangial matrix expansion of diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2012;122:114-121. (査読有)

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M, Wanibuchi H: Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients:

Nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1889-1897. (査読有)

Nakatani S, Kakehashi A, Ishimura E, Yamano S, Mori K, Wei M, Inaba M, Wanibuchi H: Targeted proteomics of isolated glomeruli from the kidneys of diabetic rats: Sorbin and sh3 domain containing 2 is a novel protein associated with diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2011;2011:979354. (査読有)

[学会発表](計 9件)

石村栄治、仲谷慎也、鰐淵英機、稲葉雅章. 腎疾患における初発発現の検討 初発は糖尿病性腎症で高度に発現する. 第25回日本糖尿病性腎症研究会 2013年12月7日(東京)

Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Wanibuchi H, Inaba M. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. 50th European Renal Association and European Dialysis and Transplantation Association Congress 2013.6 18-21 (Istanbul, Turkey)

Nakatani S, Ishimura E, Tsuda A, Tateishi Y, Fukumoto S, Inaba M. Nephronectin Is a Novel Protein Associated with Diabetic Nephropathy. *American Society of Nephrology* 2012.11 -16(San Diego, CA)

仲谷 慎也、嶋 英昭、森 克仁、石村 栄治、稲葉 雅章: 腎疾患におけるネフロネクチンの発現の検討 ネフロネクチンは糖尿病性腎症で高度に発現する. 第56回日本腎臓学会学術総会 2013年5月10~12日(東京)

仲谷 慎也、魏 民、森 克仁、石村 栄治、鰐淵 英機、稲葉 雅章. 単離糸球体を用いたプロテオミクス-ネフロネクチンと

糖尿病性腎症の関連. 第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月1~3日(横浜)

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Inaba M, Wanibuchi H. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. 48th European Renal Association and European Dialysis Transplantation Association (Prague Czech, 2011.6.23-26)

仲谷 慎也、石村 栄治、嶋 英昭、森 克仁、稲葉 雅章. 糖尿病ラットの糸球体における細胞骨格関連蛋白質のプロテオミクス. 第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15~17日(横浜)

仲谷 慎也、魏 民、山野 莊太郎、石井 真美、梯 アンナ、鰐淵 英機. ヒト剖検例の単離糸球体を用いた糖尿病性腎症のプロテオーム解析. 第100回日本病理学会総会 2011年4月28~30日(横浜)

Proteome analysis of isolated glomeruli of rats with non-insulin dependent diabetes mellitus. 第53回日本腎臓学会学術総会 2010年6月16~18日(神戸)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石村 栄治 (ISHIMURA, Eiji)
大阪市立大学大学院医学研究科腎臓病態内科学 准教授
研究者番号: 20145775

(2)研究分担者

梯 アンナ (KAKEHASHI, Anna)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60382222

仲谷 慎也 (NAKATANI, Shinya)
大阪市立大学・大学院医学研究科・幸喜臨床研究医
研究者番号: 80701325

(3)連携研究者

なし