

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461370

研究課題名(和文) 血清プロテオーム解析で見出した2型糖尿病関連蛋白質の機能解析

研究課題名(英文) Proteomic Analysis of Serum Biomarkers for Pre-diabetes

研究代表者

久保田 浩之(卯木浩之)(Unoki-Kubota, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：40323290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究にて2型糖尿病関連タンパク質の一つとして同定したserine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3 (SERPINA3)の2型糖尿病との関連を、非肥満性の新規2型糖尿病モデルラットLong Evans Agouti (LEA)ラット、およびヒト2型糖尿病患者において検討した。LEAラットの血清SERPINA3濃度は前糖尿病状態から糖尿病発症にいたる過程まで持続して上昇していた。ヒト2型糖尿病患者における解析でも血清SERPINA3濃度は非糖尿病対照群に比べて有意に上昇しており、2型糖尿病の病態との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify early diagnostic markers for type 2 diabetes mellitus (T2DM) that are maintained throughout a diabetic phenotype, we performed serum proteomic analysis, and identified serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3 (SERPINA3) as one of the candidate biomarkers for T2DM. We further validated the differential expression of SERPINA3 both in LEA rat, a spontaneous animal model of T2DM without obesity, and in human T2DM patients. SERPINA3 were increased significantly in the sera of LEA rats compared with age-matched BN rats at all three time points (8-24 week-old). Serum levels of SERPINA3 were significantly higher also in T2DM patients than in healthy control subjects. In multiple linear regression analysis, HbA1c, estimated glomerular filtration rate, and the homeostasis model assessment index of insulin resistance were independently associated with SERPINA3 levels. These findings suggest a possible role for SERPINA3 in the development of the early stages of T2DM.

研究分野：糖尿病学

キーワード：2型糖尿病 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病罹患患者は日本において 950 万人、予備軍も含めて 2050 万人(平成 24 年国民健康・栄養調査)と、成人の 5 人に 1 人が該当し、失明、人工透析、下肢切断や動脈硬化性疾患などの重篤な合併症により、健康寿命や医療費の面で大きな問題になっている。糖尿病や糖尿病性血管合併症を防ぐには糖尿病発症をより早期に見出すことが有用であり、例えばある自治体で実施されている、糖負荷試験による糖尿病予備群の早期特定や保険医による糖尿病患者への指導が糖尿病予防対策として効果を上げつつある。糖負荷試験による糖尿病(予備軍)患者のスクリーニングは有効であるものの、時間的な制約や副作用の点から大規模スクリーニング手段として利用するには課題があり、より負担の少ない早期診断法が必要とされる。一方、血糖値と HbA1c による糖尿病患者群の早期特定と早期介入は糖尿病や糖尿病性血管合併症の重症化予防に効果的であるが、経口糖負荷試験にて特定される耐糖能異常群を見落とす可能性がある。そこで申請者は効率的な糖尿病(予備軍)患者のスクリーニング手段を確立することを目的として 2 型糖尿病モデル KK-A^y マウス血清の網羅的定量プロテオミクス解析を行い、早期糖尿病群に特徴的な候補因子群を同定した(J Proteomics, 2013)。

2. 研究の目的

KK-A^y マウスの前糖尿病状態から糖尿病発症にいたる過程において発現上昇するタンパク質の一つとして同定した serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3 (SERPINA3)に着目し、近年報告された非肥満性の新規 2 型糖尿病モデルラット Long Evans Agouti (LEA) ラット(J Diabetes Res. 2013;2013:986462)、および 2 型糖尿病患者における血清 SERPINA3 濃度を解析し、2 型糖尿病との関連を検討した。

3. 研究の方法

LEA ラットにおける解析では、8 週齢、16 週齢、24 週齢雄 LEA ラット(各 4 匹)、および対照 Brown Norway (BN)ラット(各 5 匹)より空腹時血清を採取した。2 型糖尿病患者における解析では、国立国際医療研究センター病院 糖尿病内分泌代謝科に通院する 2 型糖尿病患者 68 名、および人間ドック科を受診した非糖尿病者 98 名より血清を採取した。ヒト血清、および付随する臨床情報は国立国際医療研究センターでの倫理委員会により承認を受け、患者のインフォームドコンセントを取得できたものを用いた。

LEA ラット血清中の SERPINA3 濃度の測定は Sciex 社製 QTRAP 5500 を用いた multiple reaction monitoring (MRM)法にて測定した。

測定対象としたペプチド配列は、NVVFSPLSISAALAVVSLGAK (70-90 A.A.)、および AVLDVAETGTEAAAATGVK (359-377 A.A.)であり、各ペプチドに対し 4 種の MRM transition を設定した。NVVFSPLSISAALAVVSLGAK に対する MRM transition の設定値 [Q1(m/z) / Q3(m/z) / CE(V)]は 681.8/475.3/38.09、681.8/574.4/38.09、681.8/673.4/38.09、681.8/744.5/38.09 とし、AVLDVAETGTEAAAATGVK に対する MRM transition の設定値は、592.1/475.3/33.6、592.1/546.3/33.6、592.1/617.4/33.6、592.1/688.4/33.6 とした。当該ペプチドの定量値は、当該ペプチドを対象とする MRM transition により検出されるピークのうちもっともシグナル強度の強いピークから算出された曲線下面積の、内分標準として MRM 測定の際に同時に添加したペプチド (YL¹³YEIAR, L¹⁵は ¹³C、および ¹⁵N にて標識)によるシグナル曲線下面積に対する比とした。ヒト血清中の SERPINA3 濃度は ELISA 法にて (Immunology consultants laboratory Inc. 製)実施した。

4. 研究成果

(1) LEA ラットにおける血清 SERPINA3 濃度の解析

MRM 法にて測定対象とした当該ペプチドを検出するための 4 種の MRM transition に対応するピークが MRM 測定の際に同一溶出時間に検出されることを確認した。また、設定 transition により測定対象とする SERPINA3 中のペプチドが検出されることを MRM-triggered MS/MS により確認した。

確立した MRM 測定条件を用いて 8 週齢、16 週齢、24 週齢雄 LEA ラット、および対照 BN ラット血清中の SERPINA3 濃度を測定した。AVLDVAETGTEAAAATGVK を対象とした定量解析では、8 週齢 LEA ラット、BN ラットの血清 SERPINA3 濃度はそれぞれ、 2.4 ± 0.7 (A.U.)、 0.9 ± 0.5 (A.U.)となり、LEA ラットで BN ラットよりも有意な高値を認めた。また 16 週齢 (LEA: 1.6 ± 0.5 , BN: 0.7 ± 0.2 , $P < 0.05$)、24 週齢 (LEA: 0.7 ± 0.2 , BN: 0.4 ± 0.1 , $P < 0.05$)でも LEA ラットにおける血清 SERPINA3 濃度は BN ラットに比べて有意な高値を示した。一方、NVVFSPLSISAALAVVSLGAK を対象とした定量解析でも 8, 16, 24 週齢 LEA ラットにおける血清 SERPINA3 濃度は BN ラットに比べて一貫して有意な高値を示し続けた (8 週齢 LEA: 0.14 ± 0.05 , 8 週齢 BN: 0.06 ± 0.01 ; 16 週齢 LEA: 2.7 ± 0.4 , 16 週齢 BN: 1.1 ± 0.2 ; 24 週齢 LEA: 0.7 ± 0.2 , 24 週齢 BN: 0.4 ± 0.1)。

なお、LEA ラットにおける SERPINA3 発現亢進の責任臓器を特定する目的で、LEA ラット、BN ラット各種臓器における SERPINA3 mRNA の発現差異を検討した。解析の結果、LEA ラット

ト、BN ラット間で発現差異を呈した臓器は肝臓、腎臓、膵臓であり、いずれの臓器においても LEA ラットにおける SERPINA3 mRNA 発現量は BN ラットに比べて有意に高かった。また、肝臓における SERPINA3 mRNA 量は肝臓、ならびに膵臓における mRNA 量の約 1,000 ~ 10,000 倍であることから、LEA ラットにおける血清 SERPINA3 濃度上昇は、肝臓における mRNA 発現亢進を反映しているものと想定した。

以上の解析結果より、KK-A^y マウスの前糖尿病状態から糖尿病発症にいたる過程において発現上昇する SERPINA3 タンパク質は、別の 2 型糖尿病モデルである LEA ラットでも前糖尿病状態から糖尿病発症に渡って発現上昇を認めることを検証した。

(2) 2 型糖尿病患者における血清 SERPINA3 濃度の解析

性別、年齢、BMI を一致させた 2 型糖尿病患者 68 名、ならびに非糖尿病患者 98 名より空腹時血清を採取し、血清 SERPINA3 濃度を ELISA 法にて測定した。対照群、ならびに 2 型糖尿病患者群における血清 SERPINA3 濃度はそれぞれ、 158 ± 24 、 169 ± 38 ($\mu\text{g/mL}$) であり、対照群に比べ 2 型糖尿病患者群において有意な高値を認めた。次に解析対象者に付随する臨床情報を用いて血清 SERPINA3 濃度との単回帰分析を行った結果、血清クレアチニン濃度と有意な正の相関を ($r = 0.16$, $P < 0.04$)、eGFR と有意な負の相関を ($r = -0.17$, $P < 0.03$) 示した。さらに血清 SERPINA3 濃度を目的変数とする多重回帰分析を実施した結果、HbA1c ($\beta = 0.25$)、eGFR ($\beta = -0.23$)、HOMA-IR ($\beta = -0.23$) が血清 SERPINA3 濃度の独立した規定因子として抽出された。以上の解析結果より、SERPINA3 タンパク質は 2 型糖尿病の病態と関連することが推測された。

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 2 件)

Takahashi E, Okumura A, Unoki-Kubota H, Hirano H, Kasuga M, Kaburagi Y, Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK-A^y mouse model using the iTRAQ technique, J Proteomics, 査読有, 84:40-51, 2013, DOI:10.1016/j.jprot.2013.03.014

Okumura A, Unoki-Kubota H, Matsushita Y, Shiga T, Moriyoshi Y, Yamagoe S, Kaburagi Y, Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver, BioScience

Trends, 査読有, 7(6):276-83, 2013, DOI:10.5582/bst.2013.v7.6.276

〔学会発表〕(計 8 件)

久保田 浩之、高橋 枝里、本田律子、志賀智子、奥村 彰規、梶尾裕、野田光彦、樋木 康志、非標識定量プロテオミクス法による糖尿病腎症関連尿マーカーの探索、第 30 回日本糖尿病合併症学会、2015.11.27-29、名古屋

Unoki-Kubota H, Takahashi E, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Okumura A, Kajio H, Noda M, Kaburagi Y, Label-free quantitative urinary proteomic analysis for discovering biomarkers of diabetic nephropathy, Keystone symposia Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies, Oct 25-29, 2015, Kyoto

高橋 枝里、久保田 浩之、清水 有紀子、奥村 彰規、岡村 匡史、本田律子、梶尾裕、野田光彦、樋木 康志、非肥満性 2 型糖尿病モデルラット LEA ラットの血清プロテオーム解析による 2 型糖尿病関連因子の探索、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015.5.21-24、下関

久保田 浩之、高倉 美智子、奥村 彰規、高橋 枝里、岩田 和希子、本田 律子、梶尾裕、野田 光彦、樋木 康志、尿中 serine protease inhibitor A3 と糖尿病腎症との関連の検討、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015.5.21-24、下関

高橋 枝里、久保田 浩之、清水有紀子、奥村 彰規、岡村 匡史、本田律子、梶尾裕、野田光彦、樋木 康志、非肥満性 2 型糖尿病モデルラット LEA ラット血清を用いた 2 型糖尿病関連蛋白質の探索、第 52 回日本臨床分子医学会学術集会、2015.4.10-11、京都

Takahashi E, Unoki-Kubota H, Shimizu Y, Okumura A, Okamura T, Noda M, Kaburagi Y, Proteomic Analysis of Serum Proteins in LEA Rat, a New Rat Model of Nonobese Type 2 Diabetes Mellitus, American Diabetes Association 74th Scientific Sessions, June 13-17, 2014 San Francisco, CA, USA

高橋 枝里、久保田 浩之、清水 有紀子、奥村 彰規、岡村 匡史、樋木 康志、糖尿病モデル LEA ラットの血清プロテオーム解析とヒト 2 型糖尿病患者における検討、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.22-24、大阪

久保田 浩之、高橋 枝里、奥村 彰規、平野 久、鍋木 康志、定量的プロテオミクスを用いた2型糖尿病関連因子の探索、第28回日本糖尿病合併症学会、2013.9.13-14、旭川

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久保田 浩之 (KUBOTA, Hiroyuki)
国立国際医療研究センター・研究所・室長
研究者番号：4 0 3 2 3 2 9 0

(2)研究分担者

鍋木 康志 (KABURAGI, Yasushi)
国立国際医療研究センター・研究所・部長
研究者番号：4 0 3 4 2 9 2 7