

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500870

研究課題名(和文) LDL受容体ファミリーLR11の糖尿病性血管障害における役割の解明

研究課題名(英文) The role of lipoprotein receptor LR11 in diabetic complications

研究代表者

鎌木 康志 (KABURAGI, Yasushi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・部長

研究者番号：40342927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病腎症(DN)患者における血清可溶性LR11(sLR11)濃度を測定しDNとの関連を検討した。対象は健常者(H)39名、2型糖尿病患者(T2DM)38名、DN2期患者(DN2)34名、DN3期以降患者(DN3)53名とした。sLR11濃度はHに比べDN2、DN3で有意に上昇し、sLR11($r=0.22$)、罹病期間($r=-0.22$)、収縮期血圧($r=0.17$)、HbA1c($r=0.22$)、eGFR($r=-0.24$)がACRの有意な規定因子であった。ロジスティック回帰分析ではsLR11、HbA1c、CreがDNの危険因子となった。血清sLR11の変動はDNの発症・進展と関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We sought the association between soluble form of LR11 (sLR11) and development of nephropathy among patients with type 2 diabetes (T2DM). sLR11 was determined in the serum samples of 39 healthy normoglycemic control subjects, 38 T2DM patients, 34 T2DM patients with microalbuminuria, and 53 T2DM patients with macroalbuminuria. Circulating sLR11 was significantly increased in patients with diabetic nephropathy compared with healthy subjects. Multivariate regression analysis showed that circulating sLR11 is independent contributing factor for urinary albumin to creatinine ratio (beta:0.22), as well as duration of diabetes(beta:-0.22), systolic blood pressure (beta:0.17), HbA1c(beta:0.22) and eGFR(beta:-0.24). Logistic regression analysis indicated that sLR11 was independently associated with diabetic nephropathy, as well as HbA1c and Cre. There is a statistical significant association between LR11 and albuminuria and may be a useful biomarker for the development of diabetic nephropathy.

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：糖尿病性血管障害

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病患者数は増加の一途をたどっており、約 2210 万人にも上ると試算される糖尿病有病者の減少は急務の課題であることはもちろん、医療経済学においても深刻な問題となりつつある。糖尿病の特徴は慢性的な高血糖により糖尿病性細小血管症が引き起こされることであり、自覚症状を伴わずに網膜症では失明、腎症では腎不全、神経障害では壊疽による下肢切断などへと進行する。近年、糖尿病性腎症は透析導入された患者の原疾患の第一位であり、患者数は年間約 16,000 人と透析導入の 40% 以上を占める。透析療法の導入は QOL の低下のみならず生命予後がきわめて不良となることから、腎症の効果的な治療法や予防法の開発などは急務である。ところが腎症の疾患像には未だ不明な点が多く、血糖・血圧・脂質管理などの集約的治療によって腎症の進展抑制や寛解、退縮が認められることが報告されているものの、その機序に関してはほとんど解明されていない。

申請者は国立国際医療センターで平成 15 年度から 19 年度まで行われた「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に参加し、その解析センター(プロテオームファクトリー)での質量分析器を用いた網羅的タンパク質解析システムを駆使して、糖尿病患者 124 例、健康者 42 例からの血清を用いた cleavable isotope-coded affinity tags (cICAT) 法での定量解析を行い、腎症を含む糖尿病の各合併症を有する患者血清において異なる血清蛋白プロファイルを呈することを明らかにした。また、尿検体について、限外濾過、アルブミン及び IgG 除去を組み合わせた前処理後に二次元電気泳動及び質量分析計で解析することによって 2000 個前後の蛋白を比較解析する系を確立し、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者尿から有意に変動する蛋白を 30 個以上同定している。また、培養細胞や実験動物でのプロテオーム解析にも取り組んでいる。

一方、分担研究者の久保田は動脈壁内膜平滑筋細胞に発現する LDL 受容体類似モザイク蛋白 LR11 が平滑筋細胞の遊走能促進とマクロファージの接着能・脂質蓄積能の亢進を引き起こし動脈硬化の進展に関与することを明らかにした(Ohwaki et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007; Jiang et al. JCI, 2008)。近年、LR11 にはプロテアーゼにより分断された可溶性受容体(sLR11)が血液中に存在することが知られるようになり、冠動脈疾患や増殖性網膜症患者血清で高値を示す(J Clin Invest 118:2733,2008; Am J Ophthalmol 154:187,2013)。これらの研究成果を踏まえ、LR11 あるいは sLR11 は血管平滑筋と同系由来の腎メサンギウム細胞にも作用して糸球体硬化を特徴とする糖尿病性腎症の発症・進展にも関与するのではないかと今回の研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

糖尿病腎症の発症・進展と sLR11 との関連を明らかにすることを目的に、2 型糖尿病患者を対象に血中 sLR11 濃度を測定し、糖尿病腎症の発症・進展における血中 sLR11 濃度の推移を解析した。

3. 研究の方法

性別、年齢を一致させた対照群(H, 独立行政法人国立国際医療研究センター病院人間ドック受診者) 39 名(Age:57.3 ± 7.3 years(Mean ± SD, 以下同様), 男性(M)/女性(F) = 24/15)、独立行政法人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中の 2 型糖尿病患者(T2DM)群 38 名(Age:61.1 ± 6.8, M/F = 28/10)、糖尿病腎症 2 期(DN2)群 34 名(Age:58.3 ± 10.1, M/F = 24/10)、糖尿病腎症 3 期以降(DN3)群 53 名(Age:60.5 ± 7.1, M/F = 39/14)を測定対象とした。血清 sLR11 濃度は ELISA 法にて測定した。尿中アルブミン・クレアチニン比(ACR)は対数変換した値を用いた。

4. 研究成果

H 群、T2DM 群、DN2 群、DN3 群における血清 sLR11 濃度はそれぞれ 8.0 ± 2.3 、 9.0 ± 3.0 、 10.2 ± 3.8 、 10.5 ± 3.7 (ng/ml)となり、H 群と比して DN2 群($p = 0.023$)、DN3 群($p = 0.002$)で有意に上昇した。LogACR は sLR11 と有意な正の相関を示し($r = 0.32$, $p = 4.6 \times 10^{-5}$)、また BMI($r = 0.27$, $p = 0.001$)、罹病期間($r = -0.20$, $p = 0.022$)、収縮期血圧(SBP)($r = 0.37$, $p = 1.7 \times 10^{-6}$)、HbA1c($r = 0.32$, $p = 3.2 \times 10^{-5}$)、TC($r = -0.21$, $p = 8.1 \times 10^{-3}$)、HDL($r = -0.35$, $p = 6.3 \times 10^{-5}$)、TG($r = 0.26$, $p = 8.6 \times 10^{-4}$)、Cre($r = 0.50$, $p = 2.1 \times 10^{-11}$)、eGFR($r = -0.46$, $p = 9.5 \times 10^{-5}$)、空腹時血糖(FPG)($r = 0.23$, $p = 0.004$)、BUN($r = 0.48$, $p = 8.7 \times 10^{-10}$)、UA($r = 0.24$, $p = 0.002$)とも有意な相関を認めた。多変量解析において、sLR11($\beta = 0.22$, $p = 0.002$)、罹病期間($\beta = -0.22$, $p = 0.002$)、SBP($\beta = 0.17$, $p = 0.019$)、HbA1c($\beta = 0.22$, $p = 0.008$)、eGFR($\beta = -0.24$, $p = 0.028$)が logACR の独立した規定因子となった。

糖尿病腎症(DN2 群、DN3 群)を状態変数とした二項ロジスティック回帰分析では sLR11、HbA1c、Cre が有意な説明変数であった。また、sLR11 値の第 1 四分位群(sLR11 6.7 ng/ml)を基準カテゴリーとした第 4 四分位群(sLR11 > 11.2 ng/ml)のオッズ比(OR)は 4.8 (95% confidence interval (CI):1.8-12.7, $p = 0.001$)であり、罹病期間、HbA1c、TC、HDL、TG、Cre にて調整後も、この有意な関連性は持続した(OR = 4.9, 95% CI:1.2-20.4, $p = 0.028$)。

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6件)

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

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-AY mouse model using the iTRAQ technique. *J Proteomics*. 84:40-51, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.jprot.2013.03.014

Okumura A, Suzuki T, Miyatake H, Okabe T, Hashimoto Y, Miyakawa T, Zheng H, Unoki-Kubota H, Ohno H, Dohmae N, Kaburagi Y, Miyazaki Y, Tanokura M, Yamagoe S. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein. *FEBS Lett*. 587(5): 404-9, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.025

Yokouchi H, Eto Koki, Nishimura W, Takeda N, Kaburagi Y, Yamamoto S, Yasuda K. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced by high glucose in retinal pigment epithelial cells and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells. *Acta ophthalmologica*. 91(4):e289-97, 2013. 査読有
DOI: 10.1210/jc.2010-0055

Kaburagi Y, Unoki-Kubota H. Role of the podocyte signal transduction systems in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetology International*. 2(4):160-161, 2011. 査読有
DOI: 10.1007/s13340-011-0053-8

Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis*. 11:71, 2011. 査読有
DOI: 10.1186/1471-2334-11-71

〔学会発表〕(計24件)

Okumura A, Suzuki T, Miyatake H, Miyakawa T, Zheng H, Unoki-Kubota H, Dohmae N, Kaburagi Y, Tanokura M, Yamagoe S. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein: the monomeric forms are stabilized by the zinc ion. 第36回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 神戸

奥村 彰規、久保田 浩之、松下 由実、志

賀 智子、森吉 百合子、鑑木 康志. 血中 LECT2 濃度は肥満と脂肪肝の予測因子となりうるか. 第34回日本肥満学会 2013.10.11-12 東京

久保田 浩之、高橋 枝里、奥村 彰規、平野 久、鑑木 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

Takakura M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y. Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography for Profiling of Human Urine Shotgun Proteome. HUP0 12th Annual World Congress 2013.9.14-18 横浜

Takahashi E, Unoki-Kubota H, Okumura A, Hirano H, Kaburagi Y. iTRAQ-Based Quantitation and Validation by Multiple Reaction Monitoring to Identify Diabetes-Related Biomarkers in Sera from KK-AY Diabetes Mice. HUP0 12th Annual World Congress 2013.9.14-18 横浜

奥村 彰規、久保田 浩之、松下 由実、志賀 智子、森吉 百合子、鑑木 康志. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 は新規の肥満関連因子である. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18 熊本

鑑木 康志、山下 亮、本間 綾香、梶尾 裕、野田 光彦、久保田 浩之. 蛍光ディフレーション二次元電気泳動による糖尿病腎症患者のプロテオーム解析. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18 熊本

Unoki-Kubota H, Takahashi E, Okumura A, Hirano H, Kaburagi Y. Identification of Differential Proteomes Associated with the Development of Type 2 Diabetes in the KK-AY Mice Using iTRAQ Technique. 9th IDF WPR Congress& 4th AASD Scientific Meeting 2012.11.24-27 京都

鑑木 康志、山下 亮、本間 綾香、佐藤(三城) 恵美、久保田 浩之. 尿プロテオーム解析による糖尿病腎症関連因子の探索. 第27回日本糖尿病合併症学会 2012.11.2-3 福岡

高橋 枝里、久保田 浩之、本間 綾香、平野 久、鑑木 康志. 2DICALを用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索. 日本プロテオーム学会2012年大会 2012.7.26-27 東京

久保田 浩之、岩田 和希子、山本 靖彦、岡本 宏、山本 博. 糖尿病腎症の進展に対する低分子量ヘパリンの効果の検討. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17-19 横浜

高橋 枝里、久保田 浩之、奥村 彰規、佐藤 恵美、平野久、鑑木 康志. KK-AY マウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17-19 横浜

鑑木 康志、佐藤 恵美、本間 綾香、加納 圭

子、高橋 枝里、奥村 彰規、中村 直子、佐伯 久美子、湯尾 明、平野 久、久保田 浩之。糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み。第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17-19 横浜

奥村 彰規、佐藤 恵美、久保田 浩之、籀木 康志。糖尿病性網膜症の発症プロセスに関する血中タンパク質。第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17-19 横浜

佐藤 恵美、加納 圭子、本間 綾香、高橋 枝里、奥村 彰規、久保田 浩之、籀木 康志。尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索。第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012.5.17-19 横浜

奥村 彰規、高橋 枝里、久保田 浩之、平野 久、岡村 匡史、籀木 康志。糖尿病性網膜症の発症プロセスに関する血中タンパク質の機能解析。第49回日本臨床分子医学会学術集会 2012.4.13-14 京都

高橋 枝里、久保田 浩之、奥村 彰規、佐藤 恵美、平野 久、籀木 康志。KK-A^y マウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索。第49回日本臨床分子医学会学術集会 2012.4.13-14 京都

奥村 彰規、高橋 枝里、久保田 浩之、平野 久、岡村 匡史、籀木 康志。2型糖尿病関連血清蛋白質が網膜血管内皮細胞に及ぼす影響の解析。第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16 神戸

田中 崇祐、櫻田 紳策、加納 圭子、佐藤 恵美、籀木 康志、小林 信之、慶長 直人。結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索。第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16 神戸

高橋 枝里、奥村 彰規、加納 圭子、久保田 浩之、岡村 匡史、平野 久、籀木 康志。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34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16 神戸

②1 佐藤 恵美、加納 圭子、久保田 浩之、籀木 康志。尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索。第23回糖尿病性腎症研究会 2011.12.3-4 東京

②2 本間 綾香、加納 圭子、佐藤 恵美、高橋 枝里、奥村 彰規、佐伯 久美子、湯尾 明、久保田 浩之、籀木 康志。MRM法を用いた糖尿病性細小血管症バイオマーカーの探索。日本プロテオーム学会 2011年大会 2011.7.28-29 新潟

②3 加納 圭子、本間 綾香、佐藤 恵美、高橋 枝里、奥村 彰規、佐伯 久美子、湯尾 明、久保田 浩之、籀木 康志。糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み。第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011.5.19-21 札幌

②4 高橋 枝里、岡村 匡史、加納 圭子、奥村 彰規、久保田 浩之、平野 久、安田 和基、籀木 康志。糖尿病モデル LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析による新規糖尿病マーカーの探索。第54回日本糖尿病学会年

次学術集会 2011.5.19-21 札幌

〔図書〕(計7件)

籀木 康志、久保田 浩之。メタボローム糖尿病と代謝。Diabetes Journal:糖尿病と代謝 41(4):183-186 (2013)

籀木 康志。糖尿病合併症のプロテオーム解析。カレントセラピー 31(9):981 (2013)

久保田 浩之、山岸 昌一。AGEs とインスリン抵抗性。P211-218。「AGEs と老化 - 糖化制御からみたウェルエイジング -」太田 博明 監修。山岸 昌一 編。メディカルレビュー社 (2013)

籀木 康志、久保田 浩之。糖尿病・肥満 [Perspective of proteomic studies for discovering biomarkers of diabetes and obesity]。日本臨床 70(5):769-773 (2012)

山下 亮、曾我 朋義、籀木 康志。メタボロームと糖尿病。最新医学 67(1):39-43 (2012)

籀木 康志。プロテオミクスを用いた糖尿病診断マーカーの探索。Diabetes Frontier 22(4):429-433 (2011)

久保田 浩之、籀木 康志。別冊プラクティス 糖尿病とヒトゲノム Q&A。P46-P48。安田 和基 編著。医歯薬出版(2011)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 糖尿病腎症の発症または発症リスクの検出方法及びキット

発明者: 籀木 康志、久保田 浩之、高倉 美智子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-173382

出願年月日: 2013年8月23日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgm-dmcomp.umin.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

籀木 康志 (KABURAGI, Yasushi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・研究所・糖尿病研究センター・臓器障害研究部・部長

研究者番号: 40342927

(2) 研究分担者

久保田 (卯木) 浩之 (UNOKI-KUBOTA, Hiroyuki)

独立行政法人国立国際医療研究センター・研究所・糖尿病研究センター・臓器障害研究部・室長

研究者番号: 40323290