

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16182

研究課題名（和文）糖尿病を伴う腎障害を尿中微量アルブミンより早期に診断可能なマーカーの探索と獲得

研究課題名（英文）Discovery and Selection of Urinary Protein Biomarkers for Diabetic Kidney Injuries Detectable before Microalbuminuria

研究代表者

柳田 憲吾（Yanagita, Kengo）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：10789811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：申請時には尿検体の収集数は75,000検体だったが、現在は、約150,000検体に増加し、収集も継続している。本研究では微量アルブミン尿より早期に腎障害を検出できるマーカーの探索を目的とした。研究の結果、質量分析装置を用いた尿中タンパク質の定量プロテオミクスで、糖尿病性腎症と判断された患者尿で健常者尿に比し、有意に増加したタンパク質が存在した。また、そのタンパク質の尿中増加は同一患者の微量アルブミン尿で糖尿病性腎障害と判断された一年以上前の尿で有意に増加していることも確認された。さらに、抗体測定系で尿中タンパク質量を測定した結果でも、定量プロテオミクスの結果と同様の結果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、一般的な糖尿病性腎障害マーカーである尿中微量アルブミン尿の出現より早期に尿中に排出されるタンパク質が選定された。このタンパク質は現行の微量アルブミン尿より1年以上早く糖尿病患者の腎障害の発見できると考えられた。その臨床応用は、糖尿病患者の腎障害をより早期に発見でき、より早い医療介入により、腎不全による人口透析の進展を抑制できると期待される。さらに、本研究期間で検討しきれなかった多数のバイオマーカー候補タンパク質の検証を行うことで、より良いバイオマーカーが選定されると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of collected urine samples increased from 75,000 at the time of this application to 150,000, and the collection is still on-going. In this study, urine samples of healthy subjects and diabetic patients who developed microalbuminuria (an index of renal impairment) were analyzed for discovery of biomarkers of early kidney injuries by quantitative proteomics and surface plasmon resonance (SPR) assay using antibodies. These assays elucidated several proteins, which increased in urine more than 1 year before development of microalbuminuria in diabetic patients.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：尿 バイオマーカー 糖尿病 腎障害 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病はがん、心疾患、脳血管疾患、糖尿病、高血圧性疾患、肝硬変と慢性腎不全の7つに分類される。その中で糖尿病は自覚症状が乏しく、大部分は肥満に伴う高血圧疾患と慢性腎不全との合併症を伴うことが多い。また、早期に診断されても、持続的な糖質管理や適度な運動は現代の社会では困難である。そのため、糖尿病が進行し、糖尿病性腎症になるケースが増えている(図)1)。

糖尿病性腎症は糖尿病による慢性的な高血糖で発症する血管合併症である(Nihon Jinzo Gakkai Shi. 54 (7): 487-9 2011.)。糖尿病性腎症は糸球体ろ過機能マーカーと尿細管腎障害マーカーの2つが注目されている。糸球体ろ過機能マーカーには尿中アルブミン、血清クレアチニンなどがあり、糖尿病性腎症のマーカーとして尿中アルブミンと血清クレアチニンの測定による推算糸球体ろ過量(e-GFR)が行われている(Diabetes. 61 (12): 3072-3 2012.)。尿細管障害マーカーにはKIM-1、NGALや2ミクログロブリンミンなど存在するが、一般的な臨床応用はされていない(Lab Invest. 91 (2): 190-202 2011., Clin J Am Soc Nephrol. 12 (1): 149-173 2017., Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis. 26 (3): 276-83 2015.)。また、糖尿病性腎症マーカーとしての尿中微量アルブミンは検出時には既に糸球体に障害が起きていること、血清クレアチニンは筋肉量に影響し、e-GFRが極端に低下して初めて異常値となることから、必ずしも優れたマーカーではない。このことから、糖尿病患者の尿から微量アルブミンが排出されるよりも早く検出可能な糖尿病性腎障害マーカーの獲得が期待されている。

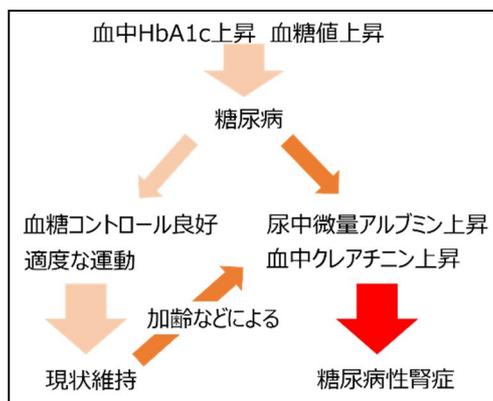


図1 糖尿病性腎症までの経緯

2. 研究の目的

現在の糖尿病性腎症の検査では、既に糸球体に障害が起きることにより尿中に排出される微量アルブミンや、筋肉量などに影響する血清クレアチニンをを用いたeGFRの計算値は必ずしも優れた検査方法ではない。

本研究では、糖尿病患者の尿から尿中微量アルブミンが排出されるよりも早く検出可能な糖尿病性腎障害バイオマーカー候補タンパク質を獲得するため、質量分析装置により健常者尿と尿中微量アルブミンが糖尿病性腎症と診断される基準値に近い糖尿病患者尿のタンパク質の同定を行い、尿中タンパク質Libraryを作成し、糖尿病性腎障害バイオマーカー候補タンパク質の選定を行う。次に選定された糖尿病性腎障害バイオマーカー候補タンパク質は抗体を基本としたSurface Plasmon Resonance (SPR)法により多検体の尿を用いて尿中タンパク質量を測定することで尿中微量アルブミンが排出されるよりも早く検出可能な糖尿病性腎障害バイオマーカーの探索と有用性の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 尿検体の選択

質量分析装置

約160,000検体の中から、健康診断で健常と判断された健常者尿と3年間の経時的に採取された糖尿病(DM)患者から尿中微量アルブミンが糖尿病性腎症(DN)と診断される基準値に近くなった同一患者(DMtoDN)の2つの時期の尿を選択する。

SPR法

質量分析装置で使用した健常者尿とDMtoDN患者のすべての時系列の尿を選択する。さらに、3年間の経時的に採取されたDM患者のDNにならなかった(DMtoDM)患者の直近の尿を選択する。

(2) 質量分析装置を用いた定量プロテオミクス解析

尿検体はメタノール/クロロホルム法によりタンパク質の沈殿を行い、沈殿したタンパク質はトリプシン消化によりペプチド化したものを尿サンプルとする。その後、サイエックス社のTriple TOF 6600質量分析装置によりペプチド化した尿検体の測定を行う。尿サンプルの測定前に質量分析装置の安定性を確認するため標準物質としてHCXをData Dependent Acquisition (DDA)測定する。一定の同定数を満たした際、尿サンプルをSequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra (SWATH)測定により定量解析用データを獲得する。得られた定量解析用データを使用してDIA-NN解析ソフトにより同定・定量化解析する。

(3) 尿中タンパク質 Library の作成と比較

DIA-NN 解析ソフトにより尿検体中のタンパク質の同定と定量解析した結果から健常者群、DM 群と DN 群の 3 グループに分け、尿中タンパク質の Library を作成する。その後、健常者群に比して DM 群と DN 群で有意にタンパク質量の増加が認められたものを糖尿病性腎障害バイオマーカー候補タンパク質として選定する。

(4) SPR 法による尿中タンパク質量の測定

選定された糖尿病性腎障害バイオマーカー候補タンパク質は抗体を基本とした SPR 法により多検体の尿中タンパク質量を測定する。

4. 研究成果

(1) 尿検体の選択

質量分析装置に使用した尿検体

健常者: 20 例(20 検体)

DMtoDN 患者: 20 例(DM20 検体、DN20 検体)

SPR 法に使用した尿検体

健常者: 93 例(93 検体)

DMtoDN 患者: 43 例(257 検体)

DMtoDM 患者: 43 例(43 検体)

(2) 質量分析装置を用いた定量プロテオミクス解析

質量分析装置での安定した解析のため標準物質として HCX の DDA 解析を行ない、その同定数が 1800 以上の時の尿検体測定データを使用した。質量分析装置の SWATH 測定で得られた定量解析用データは DIA-NN 解析ソフトによりタンパク質の同定・定量化解析し、総数で 1667 個のタンパク質が同定・定量化された。すべてのタンパク質名は特許申請の関係上、非公開とした。

(3) 尿中タンパク質 Library の作成と比較

(2)で同定・定量されたデータから健常者群に比して DMtoDN 患者群で有意差をもってタンパク質量の増加が認められたタンパク質が 126 個選択された($p < 0.05$)。病院で測定された尿中微量アルブミンと相関しており、健常者群に比して DMtoDN 患者群で高い有意差をもって増加し($p < 0.0001$)、DM 患者群に比して DN 患者群で高い有意差をもって増加していた Protein A が存在していた($p < 0.0001$)(図 2)。さらに、健常者群に比して DMtoDN 患者群で高い有意差をもって増加し($p < 0.0001$)、DM 患者群に比して DN 患者群で有意に減少した Protein B が存在した($p < 0.005$)(図 3)。

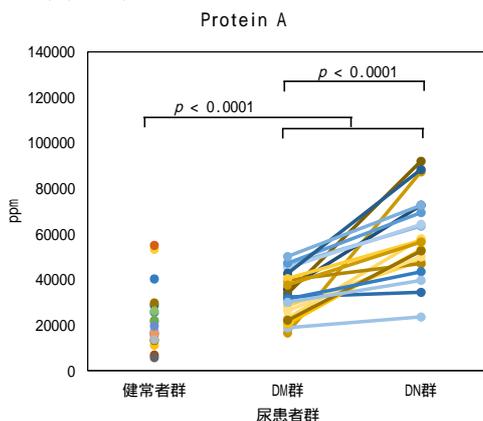


図 2 Protein A の 3 群の定量プロテオミク

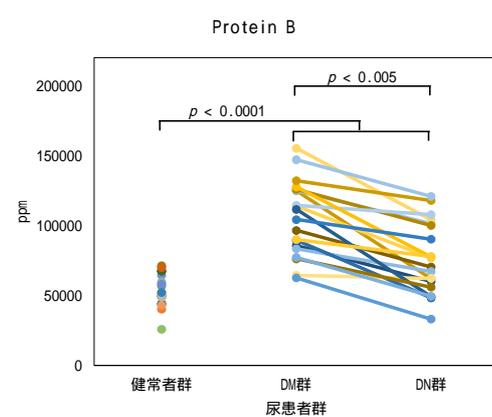


図 3 Protein B の 3 群の定量プロテオミク

(4) SPR 法による尿中タンパク質量の測定

選択された Protein B について、SPR 法により多検体の尿中タンパク量を測定した結果、尿中 Protein B 量は健常者群に比して DMtoDM 患者群で有意に増加していた($p < 0.05$)。また、DMtoDM 患者群に比して DMtoDN 患者群で有意に増加していた($p < 0.05$)(図 4)。さらに、DMtoDM 患者群に比して DMtoDN 患者群内の DN と診断されたときより前の DM 状態であっても、DN 発症の 1 年近く前から尿中 Protein B 量が有意に増加していた($p < 0.05$)(表 1)

今回、質量分析装置で測定した結果と SPR 法で測定した結果を比較したところ、SPR 法で測定した方が有意な差が認められた。これは質量分析装置で測定した場合、元々の尿の濃度を考慮しなかったためと考えられる。現在、当センターでは質量分析装置で測定した結果に尿の濃度に関する補正、またはクレアチニン補正などを行い、質量分析装置によるより正確な尿中タンパク質の定量の検討を行っている。

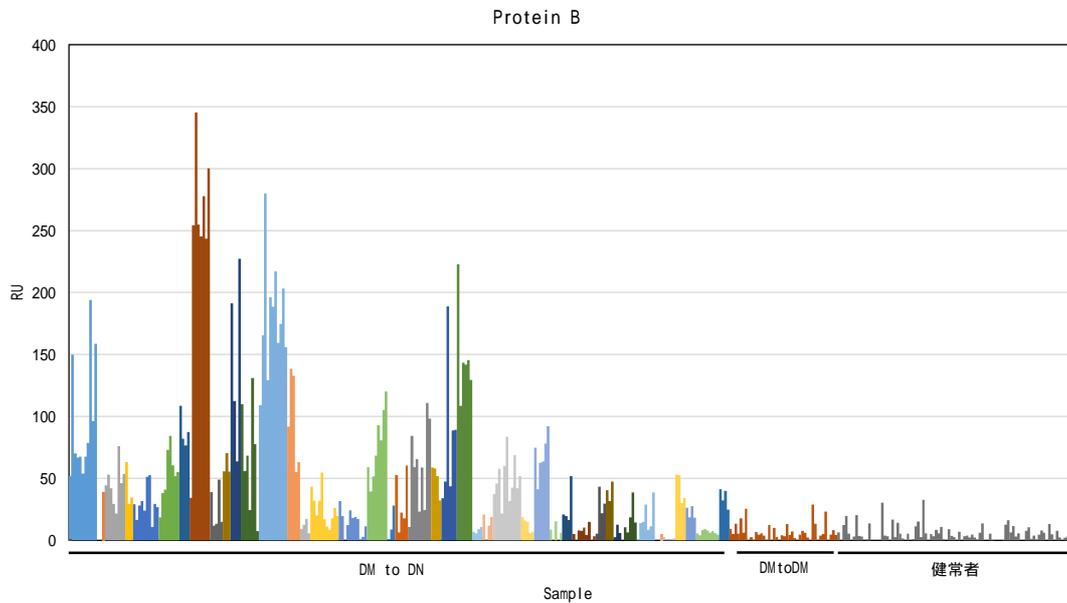


図 4 SPR 法を用いた尿中 Protein B の測定結果

表 1 DMtoDN 患者の経時的な尿中 Protein B の有意差

	Protein B			t	p Value
	Average	SD	CV(%)		
DM to DM (0) vs	6.6	6.8	103.1		
DM to DN (-720-)	22.1	21.0	94.9	1.3	0.2905622
DM to DN (-600-719)	48.5	50.9	104.9	1.8	0.1249245
DM to DN (-480-599)	30.7	23.7	77.3	2.7	0.0318132
DM to DN (-360-479)	53.2	45.4	85.4	3.2	0.0089000
DM to DN (-240-359)	79.2	76.3	96.4	3.9	0.0011134
DM to DN (-120-239)	39.2	39.7	101.4	4.2	0.0002283
DM to DN (-1-119)	49.0	60.9	124.3	3.9	0.0005148
DM to DN (0)	47.0	63.9	135.9	4.1	0.0001909
HV	4.2	5.3	125.4	-2.1	0.0425472

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kengo Yanagita, Keiko Yamamoto, Amr Elguoshy, Tomohiro Uchimoto, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Search for biomarkers for early detection of renal impairment in diabetic patients
3. 学会等名 HUP02022 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳田 憲吾、山本 恵子、Amr Elguoshy、内許 智博、山本 格
2. 発表標題 糖尿病患者の尿バイオマーカー探索のための定量プロテオミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Amr Elguoshy, Keiko Yamamoto, Yoshitoshi Hirao Tomohiro Uchimoto, Shuichiro Shimada, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Endogenous peptide cluster approach for human peptidome profiling in the context of gender-age variability
3. 学会等名 HUP02022 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko Yamamoto, Tomohiro Uchimoto, Amr Elguoshy, Kengo Yanagita, Shuichiro Shimada, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Quantitative Proteomics for Net Amount of Urinary Tract Tissue-derived Urine Proteins by Subtraction of Plasma proteins from Urine proteome
3. 学会等名 HUP02022 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Amr Elguoshy, Keiko Yamamoto, Kengo Yanagita, Tomohiro Uchimoto, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Urinary Glycoproteomic Analysis for discovering Novel Biomarkers of DM
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 恵子、柳田 憲吾、Amr Elguoshy、内許 智博、山本 格
2. 発表標題 尿プロテオームから血漿プロテオームを除いた腎・泌尿器系組織由来の尿の定量プロテオミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 慢性腎臓病の尿検査方法	発明者 山本 格、柳田 憲吾、山本 恵子、吉川 智啓	権利者 国立大学法人新潟大学、東ソー株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2022-011271	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

新潟大学生体液バイオマーカーセンター http://bb-c.gs.niigata-u.ac.jp/shintyoku.html

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------