

課題番号 : 26指104  
研究課題名 : 糖尿病腎症の新規尿蛋白質マーカーに基づく診断・治療法の開発  
主任研究者名 : 鏑木康志  
分担研究者名 :

キーワード : 糖尿病腎症、バイオマーカー、プロテオーム、メタボローム  
研究成果 :

糖尿病を含む代謝疾患では、長期間代謝異常が持続すると、動脈硬化性疾患や糖尿病に特徴的な微細な血管の機能及び形態異常による糖尿病性細小血管症が生じ、進行すると重篤な合併症をきたす。これらの糖尿病性細小血管症は重篤な合併症が進行するまで自覚症状を伴わないことが多く、日常診療の現場でその病期や予後・進行性などを診断可能なバイオマーカーが開発できればその意義は高い。我々は糖尿病腎症(DN)を含む糖尿病性血管合併症を早期に発見、あるいは予見し、効果的な治療法を開発することを目的としたバイオマーカー開発に取り組むことを目的に、国立国際医療研究センター、JR 東京総合病院、富山大学附属病院に通院する2型糖尿病患者1028名より血清、尿検体の収集、ならびに附随する臨床データを取得した。本研究の目的の一つは、我々が先行研究にて収集した2型糖尿病患者を対象とした血清、尿検体、ならびに附随する臨床データを用い、2型糖尿病、ならびに糖尿病性血管合併症を早期に発見、あるいは予見し、効果的な治療法の開発に貢献し得るバイオマーカーを探索することにある。DN関連バイオマーカー探索では、DN患者の尿検体を用いた非標識定量プロテオーム解析により糖尿病性腎症病期3・4期(DN3・4)群、糖尿病性腎症病期1期(DN1)群間で濃度差異を呈する104種類の尿中タンパク質を同定した。そのうちの9種の尿中タンパク質濃度について健常人対照群、DN1群、糖尿病性腎症2期(DN2)群、DN3・4群から構成される独立した集団77名を対象にmultiple reaction monitoring定量法にて検証した結果、これらの尿中タンパク質濃度は糖尿病性腎症の重症度に応じて変動していた。また、尿中afamin-クレアチニン比(Afa/Cr)はDN病期の進行に伴い上昇するのみならず、健常者群に比べDN1群にて高値であった。さらに、afamin、CD44 antigen、lysosome-associated membrane glycoprotein 2の3タンパク質の尿中濃度はACR、およびeGFRの両指標と有意な相関を認めた。

次に本研究にて開始した2型糖尿病患者を対象としたコホート研究では、本計画への参加に同意した先行研究参加者を中心に年1回の臨床検体および臨床情報を収集している。参加施設毎にコホート研究開始時期が異なっているものの、2018年3月末時点における検体収集数は、初年度(平成26年度)510検体、2年度(平成27年度)549検体、3年度(平成28年度)411検体であり、収集検体目標数の7割ほどの集団にてコホート研究を継続している[研究報告書(パワーポイント)1]。なお、本研究のコホート研究に参加している一部の2型糖尿病患者については先行の横断研究(平成20~24年度実施)においても臨床検体および臨床情報の提供を受けているため、糖尿病性腎症重症度の経時的な推移を追跡することが可能となった。平均追跡期間3年間の糖尿病性腎症病期推移は、DN1→DN1群80例、DN1→DN2群43例、DN2→DN1群18例、DN2→DN2群52例、DN2→DN3・4群11例となった。研究登録時DN1期であった123名を対象に尿中Afa/Crを測定した結果、DN1→DN1群に比べDN1→DN2群で有意な高値を認めた。また、研究登録時DN2期であった81名の解析では、DN2→DN2群に比べDN2→DN3・4群で有意な濃度高値を、また、DN2→DN2群に比べDN2→DN1群で有意な低値を認めた。さらに、eGFR低下群( $\leq -3.3\%/年$ )とeGFR不変群( $> -3.3\%/年$ )における比較では、eGFR低下群において尿中Afa/Crは有意な高値を示した[研究報告書(パワーポイント)2]。本研究にて同定した尿中afamin濃度変動はDNの重症化を反映するのみならず、DNの進行を反映する可能性が示された。

Subject No. : 26 指 104  
Title : Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetes and diabetic complications  
Researchers : Yasushi Kaburagi  
Key word : Diabetic kidney disease, Biomarkers, Proteome, Metabolome  
Abstract :

Over the last several years, type 2 diabetes mellitus (T2DM) has reached almost epidemic proportions all around the world. It is desirable to screen and treat glucose-intolerant individuals as early as possible, since, even before the onset of diabetes, microvasculature is gradually developed. Therefore, predictive biomarkers for T2DM and diabetic complications are urgently required, which may enable the prevention of onset and/or progression of T2DM and diabetic complications. Previously, we have performed serum proteomic analysis and found that serum SerpinA3 is associated with HbA1c. In the current study, we performed quantitative urinary proteomic analysis and identified 104 proteins were differentially excreted between the stage 3 diabetic nephropathy (DN) patients and stage 1 DN patients. Among them, 9 urinary proteins were validated to be differentially excreted between them using the independent sample set, and 3 proteins such as afamin, CD44 antigen, and lysosome-associated membrane glycoprotein 2 showed a significant correlation both with urinary albumin to creatinine ratio and eGFR. Moreover, urinary afamin level was also differentially excreted between stages 3-5 CKD patients and stages 1-2 CKD patients.

We also have been conducting a prospective study to examine the association of the identified urinary proteins with the progression or regression of DN. In the first, second, and third year of the prospective study, we have collected sera, urine and the corresponding clinical data from 510, 549, 411 T2DM patients, respectively. As we enrolled 1028 type 2 diabetic patients as cross-sectional study participants in 2008-2012, and some T2DM patients among them were enrolled also in the present prospective study, we could retrospectively analyze the changes of kidney functional decline. Thus, we retrospectively assessed the association of the urinary afamin level with the progression of DN, and found that the urinary afamin level was associated both with the progression and regression of DN, which may be useful to predict high-risk patients with DN.

# 1. 糖尿病腎症コホート研究における収集検体数、ならびに既存収集試料の概要

横断研究 (H20~24年度)      コホート研究  
 H26年度      H27年度      H28年度      H29~年度

#664:  
T2D, 143名

#G-001619-00:  
T2D, 142名

#G-001619-00:  
T2D, 131名

#A-00252-00:  
T2D, 120名

DD

#G-001619-00:  
T2D, 136名

#G-001619-00:  
T2D, 131名

#A-00252-00:  
T2D, 119名

#A-00252-00:  
T2D, 119名

DD

#664:  
T2D, 271名

#664:人間ドック科  
受診者, 649名

#664:  
T2D, 232名

#G-001619-00:  
T2D, 232名

#G-001619-00:  
T2D, 186名

#G-001619-00:  
T2D, 172名

DD

#664:  
T2D, 203名

#664:  
T2D, 179名

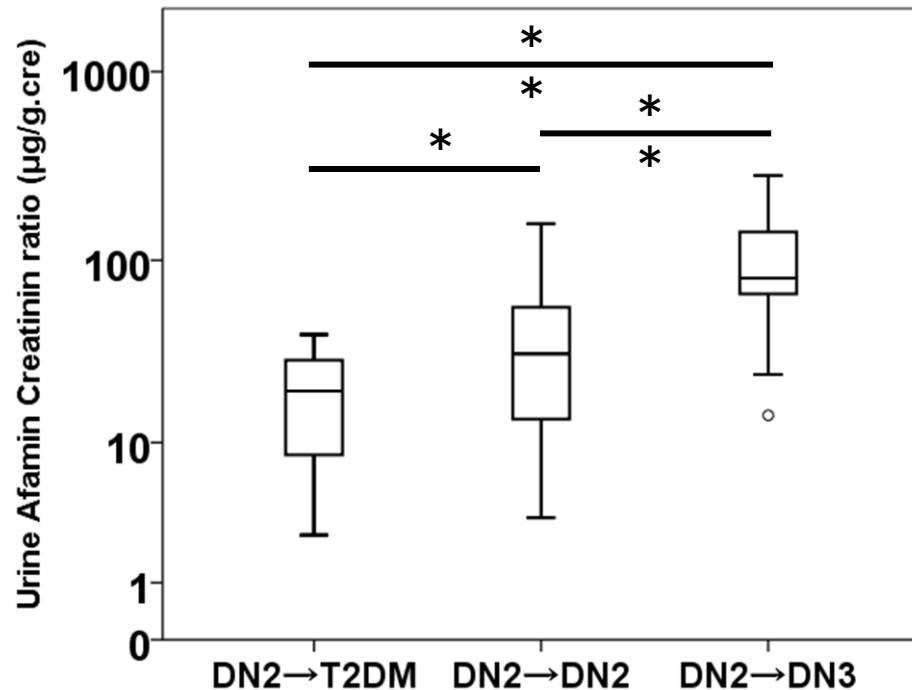
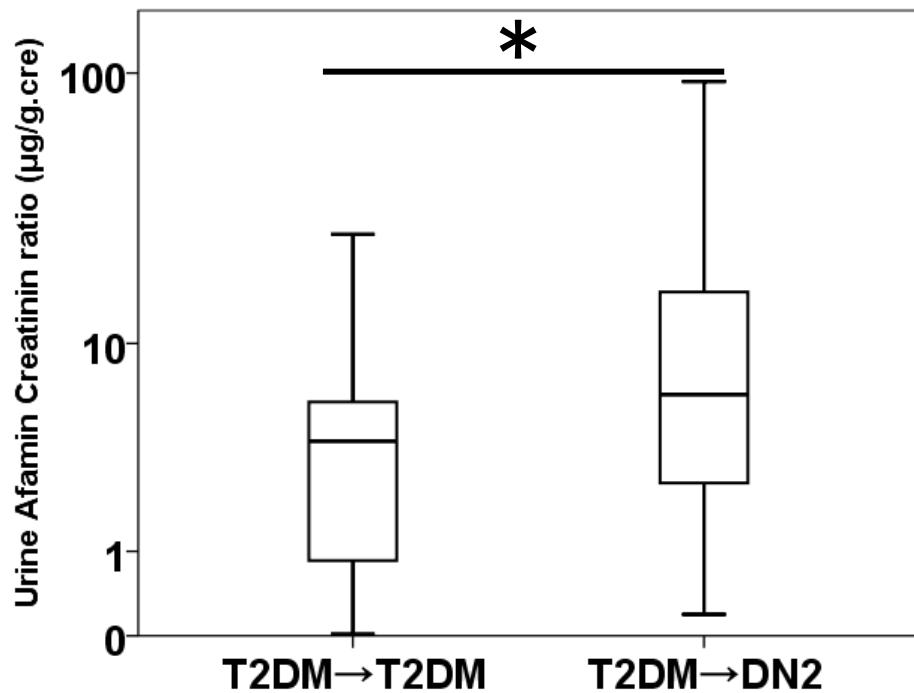
#G-001619-00:  
T2D, 101名

DD



(#はNCGM承認番号、T2Dは2型糖尿病患者)

## 2. 尿中afaminレベルは腎症非進行群に比べ腎症進行群において有意な高値を示し、糖尿病腎症の進行を反映する可能性がある。



## 研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指104

研究課題名：糖尿病腎症の新規尿蛋白質マーカーに基づく診断・治療法の開発

主任研究者名： 鏑木康志

### 論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
A type 2 diabetes-associated SNP in KCNQ1 (rs163184) modulates the binding activity of the locus for Sp3 and Lsd1/Kdm1a, potentially affecting CDKN1C expression.	Hiramoto M, Udagawa H, Ishibashi N, Takahashi E, Kaburagi Y, Miyazawa K, Funahashi N, Nammo T, Yasuda K.	Int J Mol Med.	41: 717-728	2018
Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice.	Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S.	Biochem Biophys Rep.	12: 166-171	2017
Proteomic analysis of serum biomarkers for pre-diabetes using the LEA rat, a spontaneous animal model of type 2 diabetes mellitus.	Takahashi E, Unoki-Kubota H, Shimizu Y, Okamura T, Iwata W, Kajio H, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Yamashita S, Tobe K, Okumura A, Matsumoto M, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y.	J Diabetes Investig.	8: 661-671	2017

### 学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
2型糖尿病患者における血清可溶性受容体 sLR11濃度の検討	高橋 枝里、久保田 浩之、姜美子、梶尾 裕、岩田 和希子、奥村 彰規、野田 光彦、武城 英明、鏑木 康志	第32回日本糖尿病合併症学会	東京	2017. 10. 27-29

研究発表及び特許取得報告について

尿プロテオーム解析により同定されたafaminの糖尿病腎症進行予測マーカーとしての可能性	高橋 枝里、久保田 浩之、梶尾 裕、山下 滋雄、本田 律子、志賀 智子、野田 光彦、鏑木 康志	日本プロテオーム学会2017年大会 (JHUP0第15回大会)	大阪	2017. 7. 26-28
Urinary afamin levels predict decline of renal function in patients with type 2 diabetes	Takahashi E, Unoki-Kubota H, Okumura A, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Kajio H, Yamashita S, Noda M, Kaburagi Y	American Diabetes Association 77th Scientific Sessions	米国、サンディエゴ	2017. 6. 9-14
非標識定量プロテオミクス法による糖尿病腎症関連尿蛋白質の同定	高橋 枝里、久保田 浩之、本田 律子、山下 滋雄、梶尾 裕、野田 光彦、鏑木 康志	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017. 5. 18-20
糸球体上皮細胞におけるtuberous sclerosis complex 2の役割と腎機能への影響の解析	岩田 和希子、久保田 浩之、松本 道宏、寺内 康夫、春日 雅人、鏑木 康志	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017. 5. 18-20

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。