

令和5年度 博士論文

尿中アディポネクチンの分子組成分析と
糖尿病性腎疾患に対する初期バイオマーカー
としての有用性に関する研究

河野友晴

令和5年度 博士論文

尿中アディポネクチンの分子組成分析と
糖尿病性腎疾患に対する初期バイオマーカー
としての有用性に関する研究

河野 友晴

指導教員：橋田 誠一

目次

Abstract	1
第 I 章 高分子特異的高感度アディポネクチン測定法 (Immune-complex transfer enzyme immunoassay; ICT-EIA) の開発と その自動化および腎障害指標への応用	
第 1 節 序論	3
第 2 節 目的	4
第 3 節 結果	5
第 1 項 クローン38のアディポネクチン多量体 および単量体に対する反応性の検証	5
第 2 項 T-ANおよびH-AN測定系のアディポネクチンマルチマー およびモノマー画分に対する反応性の検証	7
第 3 項 T-ANおよびH-AN測定系の分析性能の検証	8
第 4 項 DKD患者の尿中アディポネクチン多量体の組成に関する検証	10
第 5 項 T-ANおよびH-ANとDKDとの関係の検証	11
第 4 節 考察	18
第 5 節 結論	19
第二章 尿中のアディポネクチンの糖尿病性腎疾患の 初期バイオマーカーとしての有用性の検討	
第 1 節 序論	20
第 2 節 目的	20
第 3 節 結果	21
第 1 項 サンドイッチEIAとICT-EIAの異なる反応性の検証	21
第 2 項 糖尿病患者の尿中アディポネクチンの単量体 および多量体の分析	22
第 3 項 アディポネクチン指数の推定	24
第 4 項 糖尿病性腎疾患の初期バイオマーカーとしての検証	26
第 4 節 考察	26
第 5 節 結論	28
謝辞	29
方法と試薬	30
参考文献	36

Molecular composition analysis of urinary adiponectin and its usefulness as an early biomarker for diabetic kidney disease

Tomoharu Kawano

Abstract

Glomerular filtration rate (GFR) and urinary albumin excretion rate (UAER) are used to diagnose chronic kidney disease (CKD) and classify its severity. However, recent studies have reported that some patients with diabetes have impaired renal function without microalbuminuria, macroalbuminuria, or proteinuria (diabetic kidney disease: DKD), while others have decreased blood and increased urinary adiponectin levels. Moreover, previous studies have suggested that urinary adiponectin excretion is a useful biomarker to determine the degree of progression of CKD.

In the first chapter, we developed total adiponectin (iT-AN) and high-molecular-weight (HMW) adiponectin (iH-AN) assays using the fully automated immunoassay system (HI-1000) and investigated their significance over conventional biomarkers. The iT-AN and iH-AN assays exhibited high reproducibility, good linearity, and sufficient sensitivity to detect trace amounts of adiponectin in the urine sample. Moreover, after gel filtration, we analyzed the urine samples to detect the presence of different molecular isoforms. Low-molecular-weight (LMW) forms and monomers comprised the major components (93%) of urinary adiponectin in a patient with diabetes and normoalbuminuria. The urine sample from a patient with microalbuminuria contained HMW (11%) and middle-molecular-weight (MMW; 28%) adiponectin, although the levels of LMW adiponectin remained high (52%). In a patient with diabetes and macroalbuminuria, HMW (32%) and MMW (42%) were more abundant than LMW (24%). iT-AN and iH-AN levels demonstrated a higher correlation with estimated GFR (eGFR) than with UAER. Further, patients with diabetes and DKD exhibited significantly higher iT-AN levels than those without diabetes at eGFR stage 1. Moreover, iH-AN showed a similar tendency for albumin, with higher levels in patients with diabetes at eGFR stage 2 or more than in those without diabetes. Thus, urinary iT-AN and iH-AN can be potential biomarkers for diabetic nephropathy.

In the previous chapter, we developed two immune complex transfer enzyme immunoassays (ICT-EIAs) to measure trace amounts of iT-AN and iH-AN in urine. We then verified their usefulness as biomarkers for DKD. However, it has now been established that ICT-EIA exhibits more divergence in the operation step, especially for small molecules than for macromolecules.

In chapter 2, we developed T-AN and H-AN assays using the sandwich EIA (Sand-EIA). The reactivities of Sand-EIAs were compared with those of ICT-EIAs by measuring the size exclusion chromatography (SEC) fractions of the urine and adiponectin standards. Consequently, ICT-EIAs demonstrated higher macromolecular specificity. We then analyzed the molecular profile of adiponectin in the urine samples of five patients at different eGFR stages by measuring the SEC fractions of urine. The results revealed that low adiponectin levels correlated relatively well with the eGFR stage. Finally, given that SEC is time-consuming, we investigated whether the ratio of T-ANs assessed via Sand-EIA and ICT-EIA could be a good indicator of monomer adiponectin by analyzing urine samples from 77 patients with diabetes. Subsequently, the ratio significantly decreased at an earlier stage compared with other biomarkers.

In conclusion, herein, we established a new index to estimate monomer adiponectin levels in urine using Sand-EIA and ICT-EIA and determined that urinary monomer adiponectin can be an accurate early indicator of renal function deterioration in patients with diabetes.

第 I 章

高分子特異的高感度アディポネクチン測定法

(Immune-complex transfer enzyme immunoassay; ICT-EIA) の開発と

その自動化および腎障害指標への応用

第 1 節 序論

慢性腎臓病(Chronic kidney disease :CKD)は、腎機能が低下し慢性的な腎機能障害を示し、その後には透析や腎臓移植を必要とするような末期腎臓病(End stage renal disease :ESRD)へと進行する¹⁾。さらに、CKDは心血管疾患(Cardiovascular disease :CVD)の危険率を高めることが示唆されている²⁾。

糖尿病は、CKDとCVDの病態を促進し、ESRDの主要な原因疾患となっている³⁾。糖尿病患者では、糸球体の過剰濾過が起こり、微量アルブミン尿が出現し、明白なタンパク尿および糸球体濾過量 (Glomerular filtration rate :GFR) の低下の順にシフトする糖尿病性腎症(Diabetic nephropathy :DN)を発症し、最終的にESRDへと至る⁴⁾。しかし、最近の研究では、糖尿病の一部の患者で、微量アルブミン尿、マクロアルブミン尿、またはタンパク尿がない場合でも腎機能が低下していることが報告されている(糖尿病性腎臓病 ; Diabetic kidney disease :DKD)^{3,5-7)}。

CKDの重症度の診断および分類には、GFRと尿中アルブミン排泄量(Urinary albumin excretion rate :UAER)が用いられている⁸⁾。しかし、DKDの一部では、アルブミン尿を認めない例もあり、アルブミン尿だけではDKDやCKDを予測することは困難である。そのため、DKDやCKDの早期発見と早期治療が症状の進行を防止するためにもアルブミン尿の情報を補う新たなバイオマーカーが必要とされている。

アディポネクチンは腎糸球体の恒常性の維持に関与しており⁹⁾、非糖尿病の腎臓の免疫組織化学的分析により糸球体にアディポネクチンが存在することが報告されている¹⁰⁾。一方、糖尿病患者では糸球体アディポネクチンが著しく減少し、尿中アディポネクチン排泄が増加することがわかっている¹⁰⁾。その他にもいくつかの研究において、糖尿病患者の腎機能障害の進行とともに尿中アディポネクチンが増加することが確認されている¹¹⁻¹³⁾。

血中アディポネクチンの尿中への排泄機構については、十分には分かっていないが、多くの血中タンパク質と同様の過程によるものと推察される。つまり、糸球体バリアや尿細管の損傷、血管損傷などにより尿中へ排出されると考えられている¹⁴⁻¹⁸⁾。この様に、尿中アディポネクチンは腎障害の初期から進行に従い尿中排泄量が増加するため、従来のGFRやUAERに比べ、CKDの発症や進行の予測を可能とする可能性があることが示唆されている^{14,19)}。さ

らに、IgA腎症や全身性エリテマトーデスに起因する腎症で尿中アディポネクチンが増加すると報告されている^{15,16,20}。これらのことにより、尿中アディポネクチンが腎障害に対する新しいバイオマーカーとなる可能性がある。

第2節 目的

尿中アディポネクチンは血中の1/100,000程度の低濃度であるため、従来のELISAキットでは正常腎機能者の尿中濃度は測れない。そのため、先行研究において、高感度免疫複合体転移測定法(ICT-EIA)を用いた高感度アディポネクチン測定系が構築された。先行研究では、市販の2種類のモノクローナル抗体を用いた尿中総アディポネクチン(T-AN)を検出するICT-EIAの用手法が開発された²¹。

ゲルろ過分画による尿解析によると、T-ANは、高分子量(HMW)、中分子量(MMW)、低分子量(LMW)、およびモノマーの4つのアイソフォームで構成されていることが明らかになっている²¹。さらに、HMWアディポネクチン(H-AN)は、健常対象者と比較し、微量アルブミン尿患者で増加し、T-AN濃度はUAERではなく、eGFRと優位な相関を示した。そのため、尿中アディポネクチンは、eGFRの低下に対する有用なマーカーである可能性が示唆されていた²¹。

尿中アディポネクチンの分子形態は、腎機能障害の進行に応じて変化する可能性がある。そのため、尿中の微量アディポネクチンアイソフォームを検出するのに十分な感度を持ち、すべてのアディポネクチンアイソフォームを差別的に定量化できる方法の開発が必要である。そこで、先行研究とは異なったモノクローナル抗体を用いて、H-ANを特異的に測定するICT-EIA法を開発する。また、以前のT-AN測定系²¹は、用手法であり、複数の手順があり複雑で手間がかかる。それに伴い、時間を要し、臨床の現場で実施することは難しいものであった。そこで、T-AN及びH-AN測定系を自動化し、この2種類のICT-EIA法を用いて尿中アディポネクチンがCKDおよびDKDに対する新しいバイオマーカーとなるか検証する。

第3節 結果

第1項 クロウン38のアディポネクチン多量体および単量体に対する反応性の検証

ヒトアディポネクチンの球状ドメインを検出する2つの抗体、モノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(製品コード：MAB10651、クロウン：166126、抗体レジストリ：AB_2221612)、モノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(製品コード：MAB1065、クロウン：166128、抗体レジストリ：AB_2273512)、およびモノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(クロウン：38、Sysmex、兵庫、日本)を用いた。表1に示す抗体ペアの測定系を用い、アディポネクチンを測定した。

表1 アディポネクチンを測定するために使用される3つのペアの抗体クロウン名

	捕捉用抗体	検出用抗体
Pair1	166126	166128
Pair2	166128	38
Pair3	38	166126

マクロアルブミン尿症の患者から得られた尿サンプルを、ゲル濾過クロマトグラフィー(Size exclusion chromatography :SEC)により分画し、3つの異なる抗体ペアを用いたサンドイッチイムノアッセイによって測定した分画中のアディポネクチン濃度を図1に示す。クロウン166126とクロウン166128を使用した抗体ペア1は、すべてのタイプのアディポネクチンを検出した。これは、2つのクロウンの両方がすべてのアディポネクチンマルチマーとモノマーに反応することを示している。クロウン166128を抗体ペア2および3のクロウン38とともに使用した場合、HMWおよびMMWアディポネクチン画分から同じレベルまたは比較的低いシグナルが検出された。一方、LMWおよびモノマーアディポネクチン画分からのシグナルは極端に減少した。これは、クロウン38がHMWおよびMMWアディポネクチンに反応し、LMWおよびモノマーアディポネクチンには反応しないことを示している。よって、ペア1は総アディポネクチン(T-AN)の測定に、クロウン38は高分子アディポネクチン(H-AN)の測定に適していることが分かった。

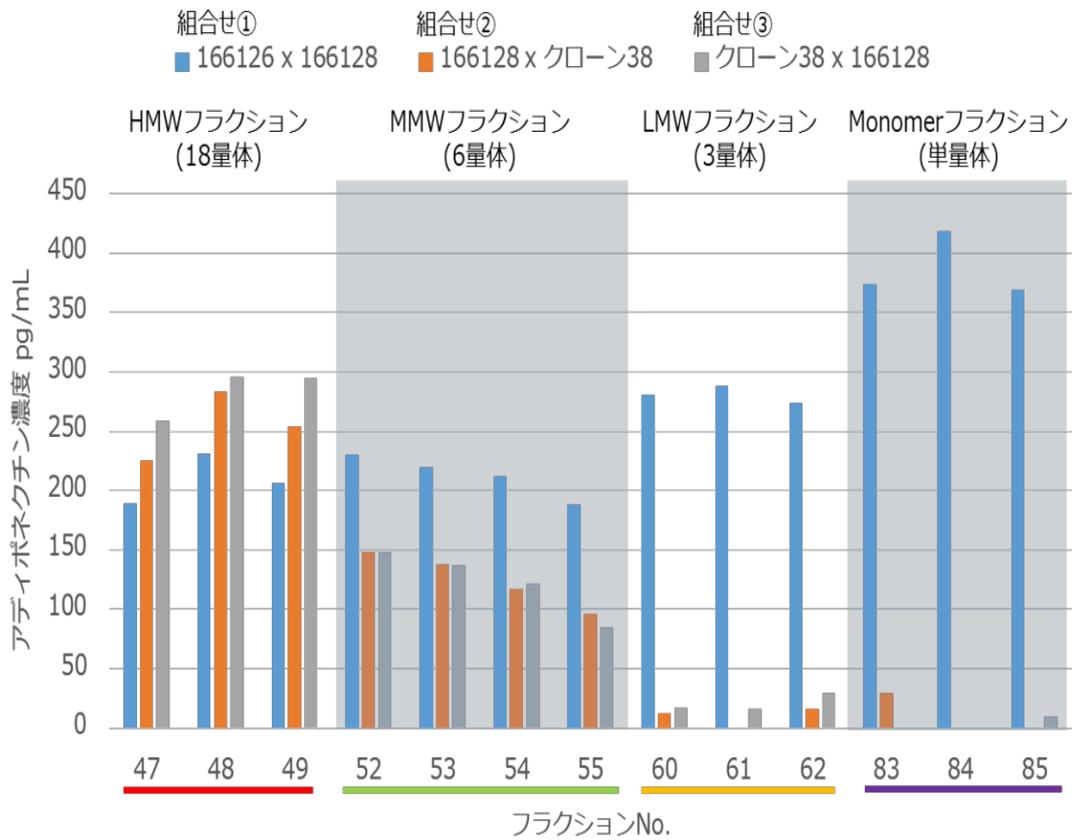


図1 3つの異なる抗体ペアを使用したサンドイッチ免疫アッセイによって測定したアディポネクチン多量体および単量体画分のアディポネクチン濃度。分画#47-49は高分子アディポネクチン(HMW)、分画#52-55は中分子アディポネクチン(MMW)、分画#60-62は低分子アディポネクチン(LMW)、分画#83-85はモノマーアディポネクチン(Monomer)を含んでいる。

第2項 T-ANおよびH-AN測定系のアディポネクチンマルチマー

およびモノマー画分に対する反応性の検証

マクロアルブミン尿症の患者から得られた尿サンプルを、SECにより分画し、T-ANおよびH-AN測定系の両方を用いて分析した(図2)。なお、より特異的に高分子アディポネクチンを測定するため、H-AN測定系には、補足および検出用抗体共に同じクローン38のペアを用いた。T-AN測定系は、手動で行った以前の研究と同様に、HMW、MMW、LMW、およびモノマーアディポネクチンそれぞれに反応し²¹⁾、4つのピークが確認できた。対照的に、H-AN測定系では、HMWアディポネクチンに対応する単一のピークとして確認できたが、若干、MMWアディポネクチンにもピークのない弱いシグナルが検出されたが、LMWおよびモノマーアディポネクチンに対するシグナルはほとんど検出できなかった。このことから、H-AN測定系の尿中のHMWに対する高い特異性が示された。

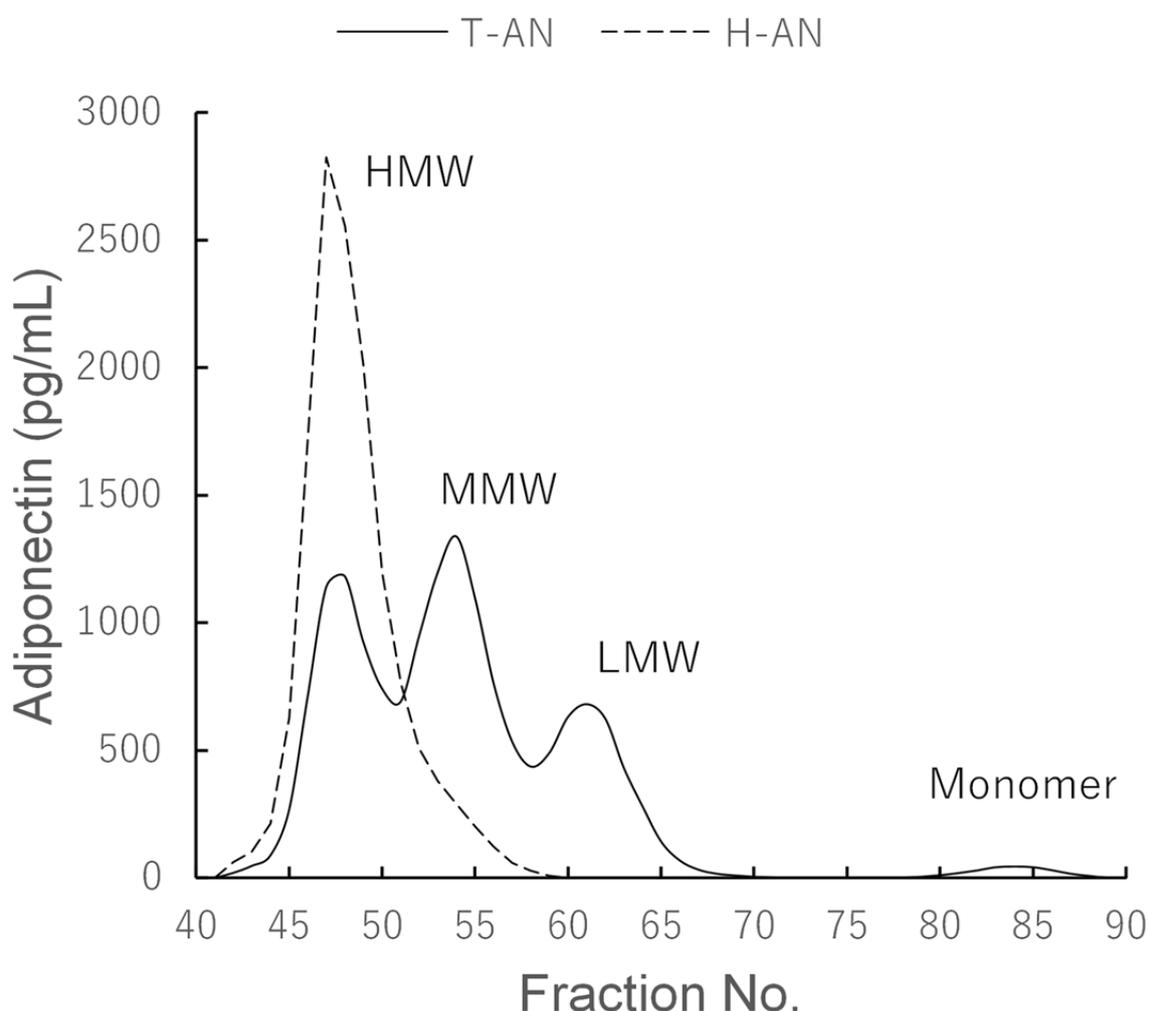


図2 尿中アディポネクチンの多量体および単量体画分に対するT-ANおよびH-AN測定系の反応性。実線はT-AN測定系、点線はH-AN測定系によるアディポネクチン濃度を著している。

第3項 T-ANおよびH-AN測定系の分析性能の検証

T-ANおよびH-AN測定系の分析性能を図3に示す。T-ANおよびH-AN測定系において、図3a、bの曲線が得られた。また、検出限界は、それぞれ低濃度サンプルの平均±3SDとし、0.05pg/ml及び0.11pg/mlとした。再現性は良好で、CVはT-ANおよびH-AN測定系でそれぞれ1.8~2.6%および2.1~5.1%(n=10)。連続希釈サンプルのテスト(図2c、d)では、T-ANおよびH-AN測定系の希釈係数に基づいて、測定された濃度と予想される濃度の比率は93~100%および98~103%であった。

T-ANの用手法ICT-EIAは以前に開発されており、CKDバイオマーカーとしての尿中T-ANの研究が報告されている²¹⁾。新たに開発したT-ANアッセイは、同じ抗体ペアを使用し、用手法ICT-EIAと同等の感度であるが、HI-1000での完全自動化プロセスにより、アッセイ時間は3日から1時間に短縮された。用手法ICT-EIAによる測定とHI-1000のT-AN測定系による測定は、強い相関関係を示した(図4)。しかし、高濃度のT-AN(50 μg/gCr以上)を含むサンプルの場合、HI-1000での測定値は用手法ICT-EIAでの測定値よりも低くなる傾向がみられた(図4a)。これらのサンプルを除外すると、傾きは1に近くなった(図4b)。

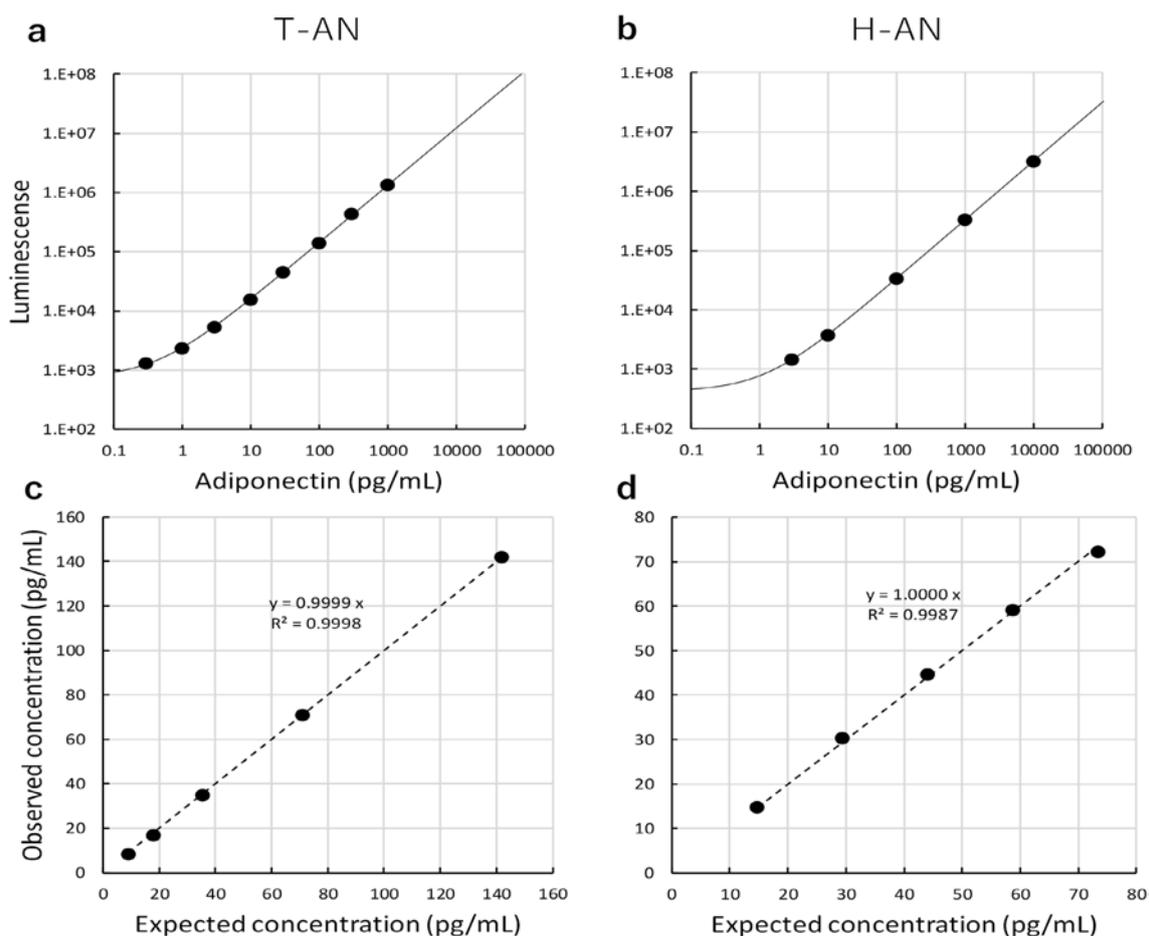


図3 T-ANおよびH-ANアッセイの分析性能。T-AN(a)およびH-AN(b)アッセイの用量および反応曲線。T-AN(c)およびH-AN(d)アッセイの希釈直線性。

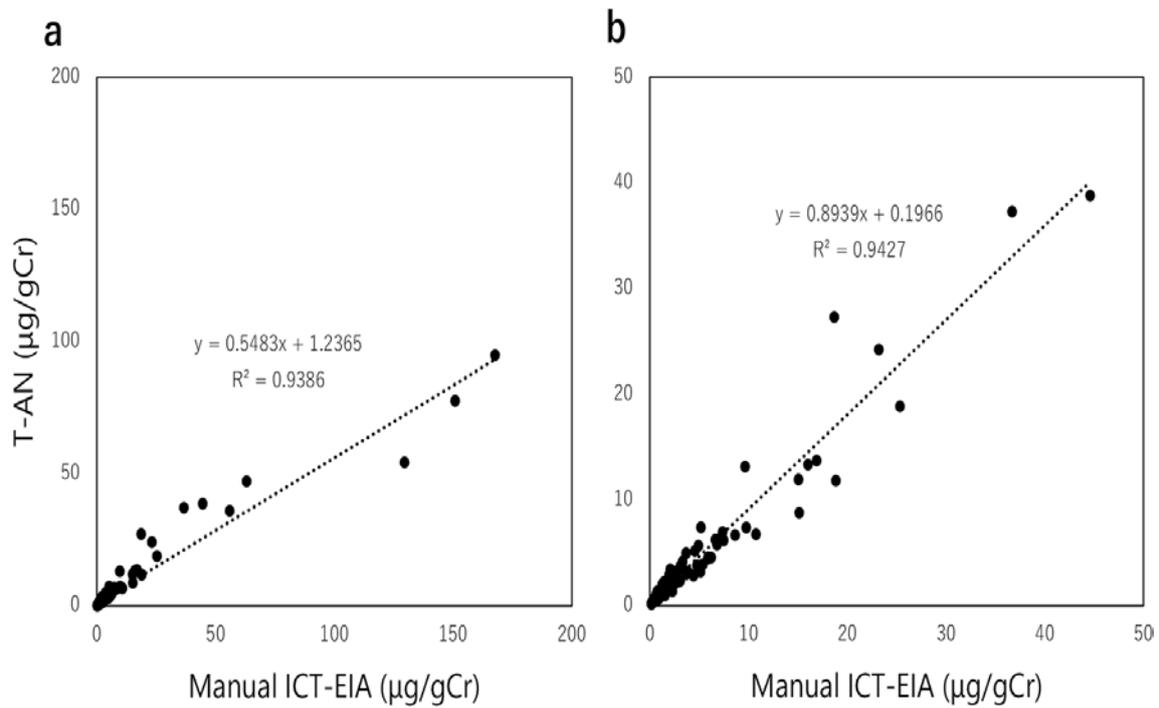


図4 尿中T-ANに対する用手法ICT-EIAおよびHI-1000による完全自動アッセイ間の相関。(a)すべてのサンプル、(b)高濃度T-AN($50 \mu\text{g/gCr}$ 以上)のサンプル除外。

第4項 DKD患者の尿中アディポネクチン多量体の組成に関する検証

図2に示したマクロアルブミン尿症の患者のデータに加えて、正常アルブミン尿の被験者とマイクロアルブミン尿症の患者からの尿サンプルもSECによって分画し、T-AN、H-AN、アルブミン、クレアチニンについて分析した(図5)。これらのサンプルの被験者の属性データを表2に示す。正常アルブミン尿では、H-ANはごく微量しか検出されないのに対し、T-AN(MMW、LMWおよびモノマーアディポネクチン)は高濃度で検出された。一方、微量アルブミン尿では、マクロアルブミン尿と同様に、T-ANとH-AN共に高濃度で検出された。これは微量アルブミン尿では、HMWおよびMMWの出現に起因する可能性が示唆された。

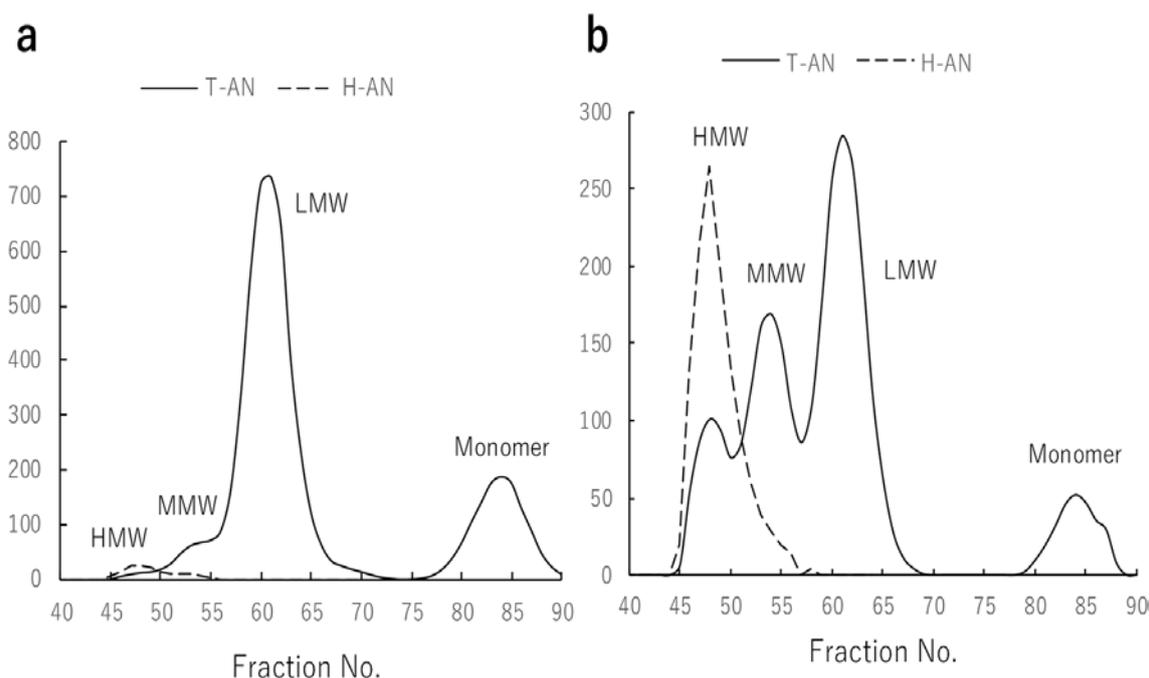


図5 正常アルブミン尿症(a)および微量アルブミン尿症(b)の患者の尿中アディポネクチンの組成。正常アルブミン尿症の被験者と微量アルブミン尿症の患者の尿サンプルをSECで分離し、T-ANおよびH-AN測定系で画分を測定した。

表2 図2および5に示す正常アルブミン尿症、微量アルブミン尿症、およびマクロアルブミン尿症の糖尿病患者における尿中バイオマーカー濃度。

	Albumin uria		
	Normo (Fig.4a)	Micro (Fig.4b)	Macro (Fig.2)
Albumin (mg/g Cr.)	7.5	83	2,926
T-AN (μg/g Cr.)	5.7	19	78
H-AN(μg/g Cr.)	0.14	8.6	78
eGFR (mL/min/1.73m ²)	100	34	43

第5項 T-ANおよびH-ANとDKDとの関係の検証

1型、2型糖尿病患者77人と非糖尿病患者97人の尿サンプルのT-AN、H-AN、アルブミン、及びクレアチニンを測定した。これらグループの属性を表3に示す。この研究では、非糖尿病の被験者グループ(42、34-49歳;中央値、25-75パーセンタイル)は、糖尿病患者グループ(62,52-69歳;中央値、25-75パーセンタイル)よりも若い集団であり、尿中バイオマーカーに影響を与える可能性がある。したがって、42~64歳のみのサブグループについても検証した。42~64歳の分析に含まれる基準の年齢は、非糖尿病患者の最大年齢と、グループ間の年齢の統計的差異が見られなかった最小年齢によって決定した。

従来のバイオマーカーとT-AN、H-ANの間のスピアマンの順位相関係数は、すべての被験者のデータを使用し、クレアチニンによって補正した。これらを表4にまとめた。T-ANおよびH-ANは、糖尿病の有無にかかわらず被験者のアルブミンと強く相関していた。さらに、T-ANとeGFR、およびH-ANとeGFRの間の相関は、特に糖尿病患者において、アルブミンとeGFRの相関よりも強かった。また42~64歳の年齢制限のあるサブグループでも同じ傾向がみられた(表5)。

表3 非糖尿病および糖尿病グループの属性。 2つのグループ間の違いを比較するために、マンホイットニーU検定を使用した。

All subjects	Non-diabetic subjects (n = 97)	Patients with diabetes (n = 77)	p
Gender (Male/female)	64/33	38/39	
Age (years)	42 (34, 49)	62 (52, 69)	< 0.001
BMI (kg/m ²)	24 (21, 26)	24 (22, 28)	0.098
Type of diabetes (1/2)	N/A	31/46	
Duration of diabetes (years)	N/A	12 (7.5, 18)	
HbA1c (%)	5.4 (5.2, 5.6)	7.1 (6.7, 7.7)	< 0.001
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	88 (76, 96)	68 (55, 83)	< 0.001
Urinaryalbumin(mg/gCr)	2.3 (1.5, 3.5)	4.2 (2.1, 35)	< 0.001
T-AN (μg/gCr)	0.89 (0.63, 1.2)	3.8 (1.4, 9.6)	< 0.001
H-AN (μg/gCr)	0.040 (0.020, 0.063)	0.21 (0.060, 1.5)	< 0.001
42–64 years old only	Non-diabetic subjects (n = 49)	Patients with diabetes (n = 41)	p
Gender (Male/female)	32/17	20/21	
Age (years)	49 (44, 56)	54 (46, 59)	0.083
BMI (kg/m ²)	24 (21, 27)	25 (22, 29)	0.38
Type of diabetes (1/2)	N/A	20/21	
Duration of diabetes (years)	N/A	9 (5.0, 16)	
HbA1c (%)	5.5 (5.2, 5.8)	7.2 (6.8, 8.1)	< 0.001
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	79 (69, 90)	77 (60, 88)	0.11
Urinary albumin (mg/gCr)	2.4 (1.7, 3.9)	3.3 (1.9, 36)	0.011
T-AN (μg/gCr)	1.1 (0.66, 1.8)	2.5 (1.2, 6.5)	< 0.001
H-AN (μg/gCr)	0.043(0.020, 0.074)	0.11 (0.051, 0.57)	< 0.001
	Median(25%,75%)		

表4 従来のバイオマーカーと尿中T-AN、H-ANとの相関。 スピアマンの相関係数を使用し算出した。ND：非糖尿病の被験者 DM：1型および2型糖尿病患者

			ND	DM	ND+DM
Albumin	T-AN	r	0.25	0.70	0.54
		p	0.014	< 0.001	< 0.001
	H-AN	r	0.47	0.75	0.66
		p	<0.001	< 0.001	< 0.001
eGFR	Albumin	r	0.013	-0.32	-0.23
		p	0.90	0.0048	0.0025
	T-AN	r	-0.079	-0.39	-0.43
		p	0.44	<0.001	<0.001
	H-AN	r	0.0017	-0.49	-0.38
		p	0.99	<0.001	<0.001

表5 従来のバイオマーカーと尿中のT-ANまたはH-ANとの相関。(42-64歳のみ)

			ND	DM	ND+DM
Albumin	T-AN	r	0.21	0.61	0.47
		p	0.15	< 0.001	< 0.001
	H-AN	r	0.51	0.75	0.66
		p	<0.001	< 0.001	< 0.001
eGFR	Albumin	r	-0.032	-0.32	-0.16
		p	0.83	0.044	0.14
	T-AN	r	0.043	-0.42	-0.21
		p	0.77	0.0062	0.046
	H-AN	r	-0.15	-0.48	-0.31
		p	0.30	0.0016	0.0028

すべての被験者の尿中アルブミン濃度により3分類(ステージA1; 30mg/gCr.未満、ステージA2; 30-300 mg/gCr.未満、ステージA3; 300 mg/gCr.以上)し、尿中バイオマーカーとeGFRの関係を図6aに示す。尿中アルブミン濃度が増加するにつれ、T-ANとH-ANの両方が増加し、eGFRが減少している。非糖尿病の被験者と比較して、T-ANおよびH-ANはステージA1、A2、およびA3の糖尿病患者で有意に増加した。同様に、T-ANおよびH-ANは、ステージA1と比較してステージA2およびA3で上昇した。さらに、T-ANとH-ANはA2と比較してA3で上昇した。eGFRも非糖尿病と比較してステージA1、A2、およびA3で有意に減少し、A1と比較してステージA2ではなくステージA3で有意な減少がみられた。42~64歳のみのサブグループの分析(図6b)では、非糖尿病患者で同様にT-ANおよびH-ANの増加がみられ、A1からA2、A3の段階に増加した。非糖尿病の被験者よりもすべてのアルブミンの分類で有意に増加した。さらに、H-ANはA1よりもステージA2、A3で有意に上昇した。しかし、T-ANの場合、ステージA3のみがステージA1よりも大幅に上昇した。eGFRの場合、ステージA3のみが非糖尿病被験者、ステージA1被験者と比較し有意な減少を示した。

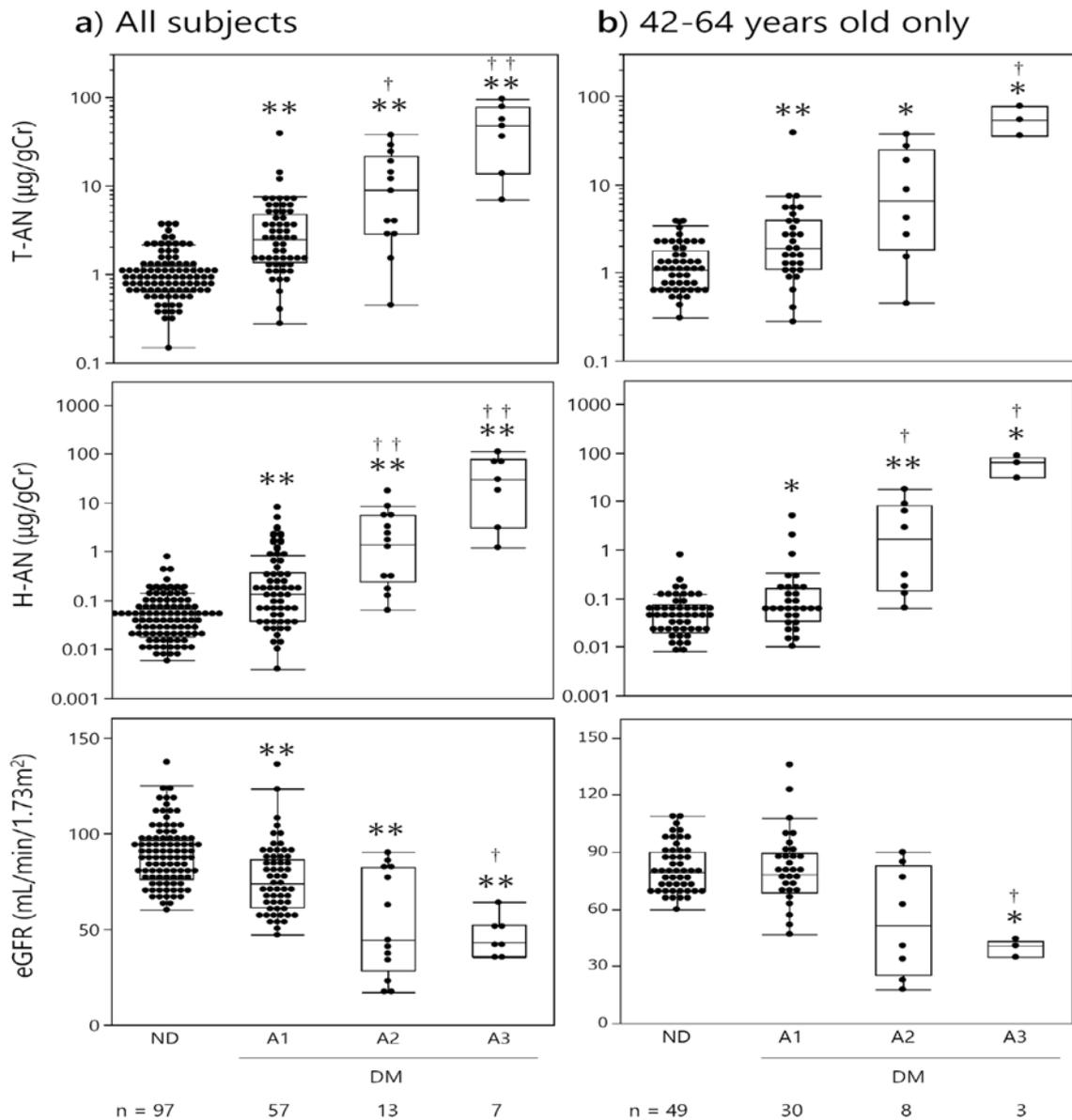


図6 各アルブミンの段階での尿中バイオマーカーおよびeGFRレベル。(a)すべての被験者。(b)42～64歳のみの被験者。アルブミンの段階は、以下の定義に従って分類された。

A1 : <30、A2 : 30-299、A3 : ≥ 300 mg / gCr。検定にはクラスカル・ウォリス検定とスチール・ドワース検定を比較に使用した。ND : 非糖尿病被験者、DM : 1型、2型糖尿病の患者。

NDと比較する場合 * :P <0.05、** :P <0.01

A1と比較する場合 † :P <0.05、†† :P <0.01。

次に、すべての被験者のeGFRにより5分類(G1: ≥ 90 、G2: 60-89、G3a: 45-59、G3b: 30-44、G4: 15-29 ml/min/1.73m²)した尿中バイオマーカーの変動を図7aに示す。上昇がみられなかったG1グループのH-ANを除いて、eGFRステージが進行するにつれて、T-ANとH-ANの両方が非糖尿病の被験者と比較して有意に増加した。アルブミンは、非糖尿病の被験者よりもeGFRステージG2、G3b、およびG4で有意に増加した。ベースラインとしてG1を使用すると、T-ANはG1ですでに有意に高かったため、eGFR低値群ではT-ANの有意な増加はみられなかった。H-ANの場合、ステージG3bはG1よりも大幅に上昇しており、この上昇はアルブミンでもみられた。42~64歳のみのサブグループの分析(図7b)では、ステージG3bで非糖尿病患者と比較し、アルブミンおよびH-ANが有意に増加したが、T-ANはステージG2およびG3bで有意に増加した。すべての参加者の結果と同様に、ステージG3aのT-ANおよびH-ANとステージG4のT-AN、H-ANおよびアルブミン値は高い傾向にあるが、統計的有意差はつかなかった。N数が小さいことが原因の可能性はある。

T-ANおよびH-ANはアルブミンと強く関連していたが、eGFRの初期段階ではアルブミンよりも早くT-ANが検出された。これらの結果により、DKDの重症度に対するT-ANおよびH-ANの応答はわずかに異なるが、T-ANおよびH-ANがDKDの初期バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

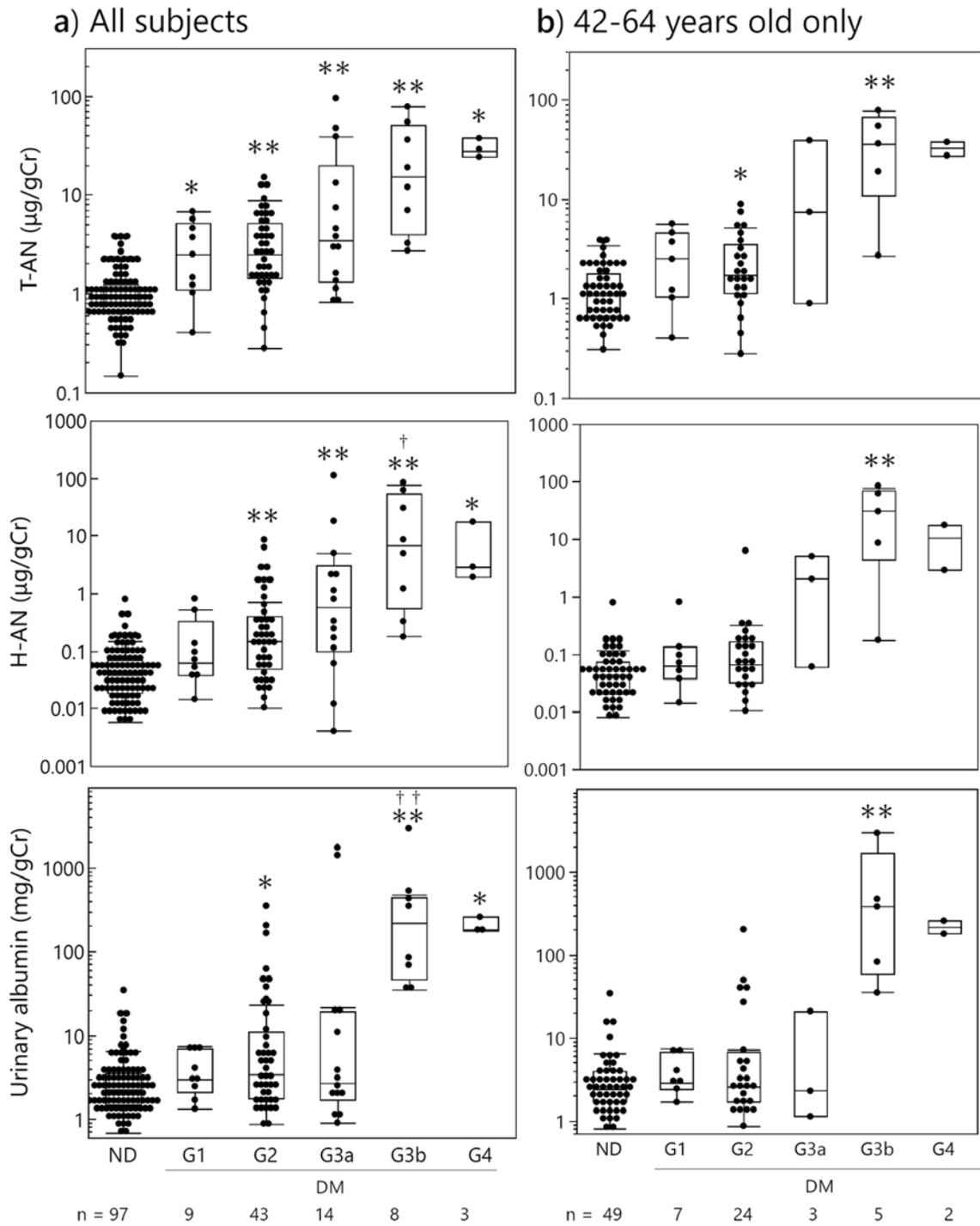


図7 各eGFRステージでの尿中バイオマーカーのレベル。(a)すべての被験者(b)42~64歳のみの被験者。eGFRステージは、次の定義に従って分類した。

G1 : ≥ 90 G2 : 60-89 G3a : 45-59 G3b : 30-44 G4 : 15-29($\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$)

検定には、ウォリス検定とスチールドワス検定を使用した。

ND : 非糖尿病被験者、DM : 1型、2型糖尿病の患者

NDと比較する場合 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

G1と比較する場合 † : $P < 0.05$, †† : $P < 0.01$ 。

第4節 考察

T-ANとH-ANの2つのアディポネクチンアイソフォームを測定するためのアッセイを開発した。T-ANの測定を行うために、2つの異なるモノクローナル抗体(どちらもアディポネクチンの球状ドメインを認識する)を使用し、すべてのアディポネクチンを検出できるように作成を行った。H-ANの測定を行うために、HMWとMMWアディポネクチンのみを検出するクローン38抗体(表1)を捕捉と検出の両方として使用し、HMWとMMWのみ反応するように作成を行った。T-ANおよびH-ANアッセイは、HI-1000で完全に自動化されており、従来の用手法ICT-EIAの3日から約1時間に測定時間が短縮されたことが、今後、臨床の現場でも実用可能な測定となりえると考えられる。また、自動化されたT-ANおよびH-ANアッセイは、高い再現性、優れた希釈直線性、および超高感度も示した。実際、T-ANおよびH-ANアッセイの検出限界はそれぞれ0.05 pg/mlおよび0.11 pg/mlであり、非糖尿病被験者の非常に低レベルの尿中アディポネクチンの正確な測定が可能になった(図6)。尿中アディポネクチンに関する以前の研究では、複数の市販の酵素結合免疫アッセイキット^{11,14,16,19)}を使用していた。そのため、これらのキットはアディポネクチンの複数のアイソフォームに対する反応性が異なる可能性があった。この研究では、完全に自動化された2つの再現性と感度の高いアッセイを開発し、尿サンプルのSEC画分を使用して、すべての尿中アディポネクチンアイソフォームに対するこれらのアッセイの反応性に関して詳細に解析した(図2、5)。

ウエスタンブロット分析によって実施された以前の研究では、尿中のモノマー、LMWおよびMMWアディポネクチンが特定されていた^{13,18)}。また、以前の報告による用手法超高感度ICT-EIAは、SEC後の尿サンプルの測定により、4種類のアディポネクチン(HMW、MMW、LMW、およびモノマー)を特定できていた²¹⁾。本論文の完全に自動化され、新しく開発されたT-ANおよびH-ANアッセイは、SEC後の尿サンプル中の各アディポネクチンアイソフォームを非常に低濃度でも測定するのに十分な感度であった(図1、4)。したがって、尿中の各アディポネクチンアイソフォームを、尿中アルブミン量の段階が異なる3人の糖尿病患者でSEC分画サンプルを使用して比較することが可能となった。比較した結果、以前の報告²¹⁾と同様に、4種類のアディポネクチン(HMW、MMW、LMW、およびモノマー)の検出に至った。さらに、正常アルブミン尿の被験者サンプル中のアディポネクチンがモノマーおよびLMWアイソフォームであるのに対し、アルブミン尿症の患者では、HMWおよびMMWアイソフォームなどの高分子の割合が高いことが確認できた(表2および図5)。尿中へのアディポネクチン排泄のメカニズムが過去に報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾が、アルブミン尿患者における多量の高分子アディポネクチンの検出は、糸球体分子バリアの破壊がDKDにおける尿中アディポネクチン排泄の増加に寄与する可能性を裏付けている。

さらに、T-ANおよびH-ANがUAERやeGFRと相関していることも示した。これは、DKDの進行を示すバイオマーカーとして使用できることを示唆している(表4)。実際、T-ANおよびH-ANを非糖尿病患者およびDKDの糖尿病患者で測定した場合、糖尿病患者のT-ANは、G1から非糖尿病患者よりも有意に高くなった(図7)。同様の傾向は、サブグループでも確認された。H-ANはアルブミンと同様の傾向を示し、非糖尿病患者と比較した場合、G2以降の

糖尿病患者で上昇が確認された。これらのことより、T-ANアッセイを使用し多種多様なアディポネクチンアイソフォームを検出することで、腎臓の初期病理学的変化を検出できる可能性が示唆された。さらに、H-ANは、DKDのバイオマーカーである可能性が示唆された。したがって、T-ANおよびH-ANはDKDのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

第5節 結論

T-ANとH-ANを測定するための2つのICT-EIAを開発し、高い再現性、良好な希釈直線性、および超高感度であることを示した。従来のICT-EIA法ではサンプルの試験に3日かかるが、新たに開発したアッセイは完全自動化されており、高感度自動測定機械HI-1000を使用することで、1時間という短い時間でアッセイが完了した。さらに、これらの新しいアッセイを使用して、尿中のT-ANとH-ANの両方が糖尿病患者で増加する可能性があり、DKDの初期バイオマーカーとして臨床的意義がある可能性があることを示した。

第II章

尿中のアディポネクチンの糖尿病性腎疾患の初期バイオマーカーとしての有用性の検討

第1節 序論

前章にて、T-ANとH-ANを測定するための2つの高感度全自動ICT-EIAを開発し、尿中のT-ANとH-ANを選択的に測定できることを示した。以降、本章のサンドイッチEIAと区別するため、ICT-EIAによるT-ANとH-ANの測定値をiT-ANおよびiH-ANとする。この2種の測定法により尿中iT-ANおよびiH-AN値は、eGFRステージが進むにつれて高くなり、従来のバイオマーカーであるUAERよりも早く上昇する可能性があることを示した^{22,23)}。また、尿中のiT-ANとiH-ANの両方が糖尿病患者で増加する可能性があり、DKDへの初期バイオマーカーとして臨床的意義がある可能性があることも示した。さらに、先行研究では、ベースラインのiH-ANが2年後のeGFRの低下と関連している可能性があることが示されている²⁴⁾。これは、iH-ANがCKDの進行を予測する可能性があることを示唆している²⁴⁾。

前章の研究では、尿サンプルをSECによりサイズ分画を行い、iT-ANおよびiH-ANアッセイによって測定し、尿中のアディポネクチンの分子量がeGFRステージによって変化することを検証した。また、先行研究でも、HWMアディポネクチンは、CKDが進行するにつれて尿中に排出される傾向があることが示された^{9,10)}。これらのことにより、腎障害の早期バイオマーカーとして尿中アディポネクチンを理解するためには、尿中アディポネクチンの組成の変動について、さらに検討する必要性が生じた。

第2節 目的

本章の目的は、eGFRの病期が異なる患者の尿中アディポネクチンの分子量組成を分析し、CKDの進行との関係および新しいバイオマーカーとしての可能性を検討することである。これまで使ってきたICT-EIAは、イムノアッセイのバックグラウンドを減少させることによってシグナルとバックグラウンドの比を低下させる技術であり、その結果、感度が高くなる。しかし、一度形成された免疫複合体は、反応過程で解離することが報告されている¹²⁾。特に低分子は高分子よりも解離が多いことが分かってきた。しかし、iT-ANおよびiH-ANのICT-EIAに対するこの現象の影響は調査されていない。

本章では、これまでに開発したICT-EIAだけでなく、尿サンプルに対する免疫複合体の解離状況を知るために新しいサンドイッチEIAの開発を行った。サンドイッチEIAによるT-ANとH-ANの測定値をsT-ANおよびsH-ANとする。このサンドイッチEIAによるsT-AN及びsH-AN測定系も自動化を行う。最終的には、この2種類のサンドイッチEIAおよび2種類のICT-EIAを用いて尿中アディポネクチンの組成を解析すると共に、CKDおよびDKDに対する新しいバイオマーカーとなるか検証する。

第3節 結果

第1項 サンドイッチEIAとICT-EIAの異なる反応性の検証

糖尿病患者から採取した尿サンプルとアディポネクチン標準をSECでサイズ分画し、各分画を図8に示すようにT-ANとH-ANのサンドイッチEIAとICT-EIAで分析した。T-ANの測定では、ICT-EIAと比較して、サンドイッチEIAは、モノマーアディポネクチンに対してはるかに高いシグナルを示し、LMWアディポネクチンに対してわずかに高いシグナルを示した。一方、ICT-EIAは、MMWおよびHMWアディポネクチンに対してわずかに高いシグナルを示す傾向があった。アディポネクチン標準の測定において、サンドイッチEIAは、MMWおよびHMWアディポネクチンに対してICT-EIAよりも低い反応性を示した。

一方、H-ANアッセイに関しては、サンドイッチEIAは尿とアディポネクチン標準の両方の測定においてMMWとHMWアディポネクチンに対してICT-EIAよりも高い反応性を示したが、ICT-EIAはHMWアディポネクチンに対してのみ反応性であり、高いHMW特異性を示していた。

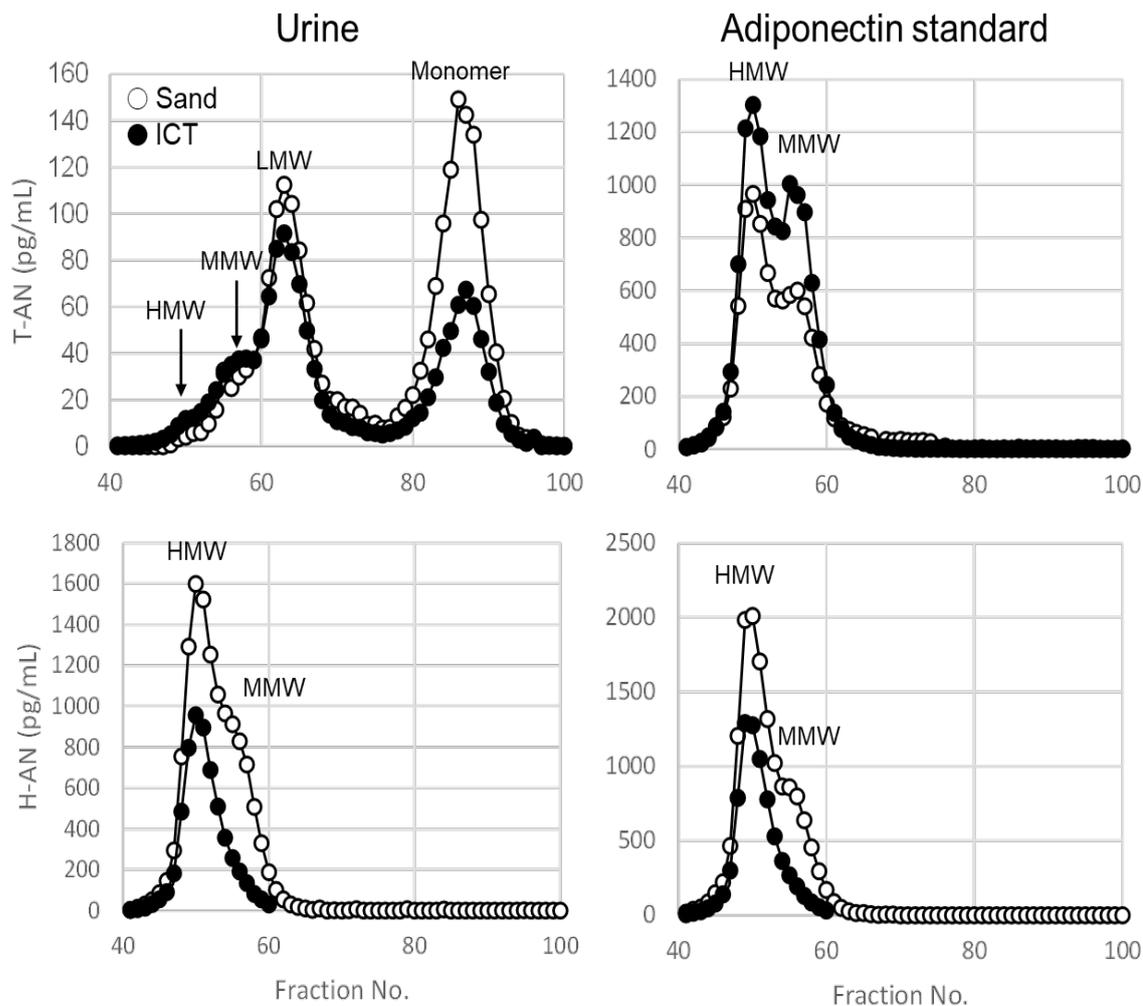


図8 サンドイッチEIAおよびICT-EIAによるT-ANおよびH-ANアッセイの特異性。糖尿病患者からの尿サンプルとアディポネクチン標準はSECによって分離し測定した。

第2項 糖尿病患者の尿中アディポネクチンの単量体および多量体の分析

eGFRが75パーセントイルのeGFRステージ1~4の糖尿病患者から収集した尿サンプルは、SECによってサイズ分画され、すべてのアディポネクチン分子形を最もよく検出することが出来るT-ANサンドイッチEIAによって分析した(図9)。ステージG1-G3aの糖尿病患者の尿では、比較的高レベルのLMWおよびモノマーアディポネクチンが検出されたが、ステージG3b-G4では、HMWおよびMMWアディポネクチンが増加していた。

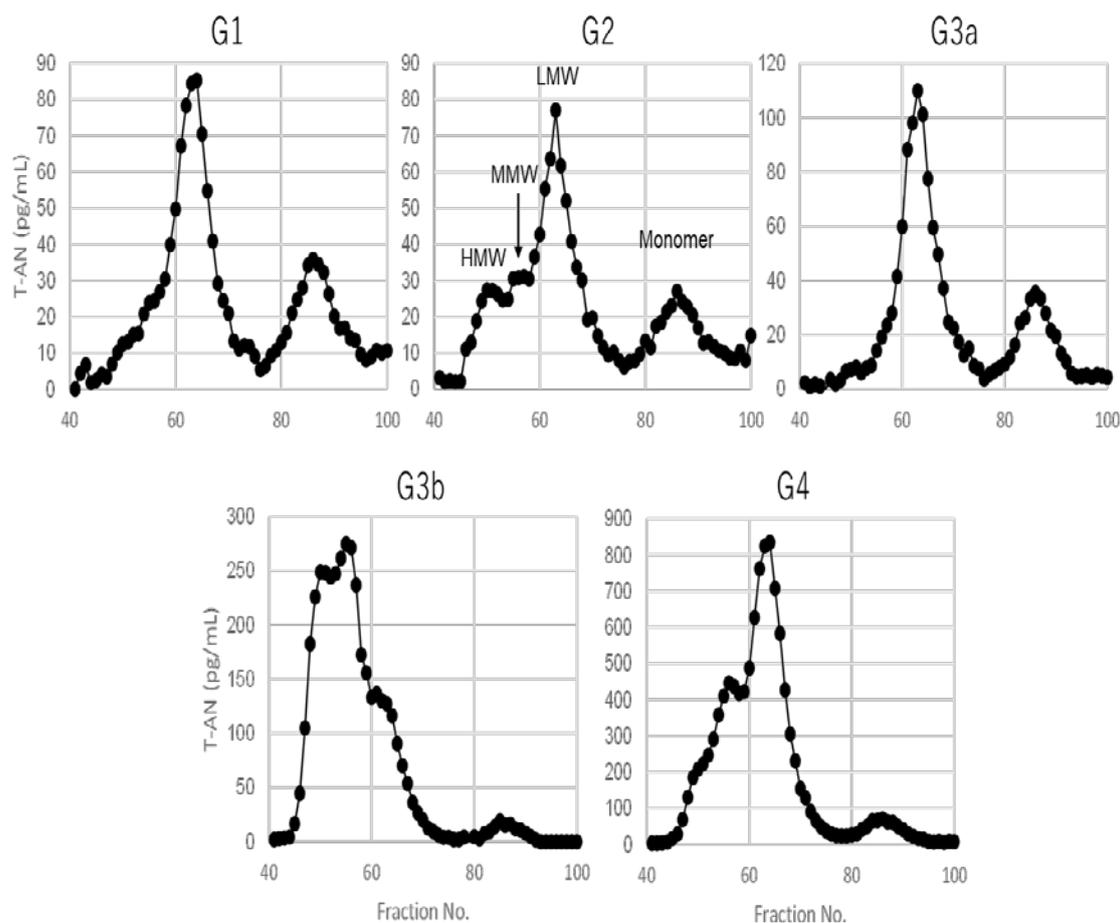


図9 糖尿病性腎疾患のG1-G4期の患者の尿中のHMW、MMW、LMWおよびアディポネクチンのモノマーの解析。糖尿病患者の尿サンプルをSECで分離し、サンドイッチT-ANアッセイで画分を測定した。

次に、それぞれのeGFRステージ1~4における25および75パーセントイルの被験者に対して同じ分析を行い、HMW (フラクションNo. 50-52)、MMW (フラクションNo. 54-56)、LMW (フラクションNo. 62-64)、およびモノマー(フラクションNo. 85-89)アディポネクチンの量、および総アディポネクチンに対するそれらの存在の比率(アディポネクチン指数)を計算した。これらのアディポネクチン指数とeGFRの相関を表6に示す。相関係数(r)は、sLMW、LMW/総アディポネクチン(sTotal)比、およびsモノマー/ sTotal比で比較的高く、低分子量アディポネクチンの変動が腎臓病の進行を反映するより強い指標となることが示された。

表6 eGFRと尿中バイオマーカー/指標値との相関。解析にはスピアマンの相関係数を使用した。

Biomarker/Index	r	p	
Albumin	-0.58	0.082	N.S.
sT-AN	-0.54	0.11	N.S.
iT-AN	-0.54	0.11	N.S.
sH-AN	-0.47	0.17	N.S.
iH-AN	-0.47	0.17	N.S.
sMomomer	-0.09	0.80	N.S.
sLMW	-0.67	0.033	(p<0.05)
sMMW	-0.58	0.082	N.S.
sHMW	-0.45	0.187	N.S.
sTotal	-0.58	0.082	N.S.
sMomomer/sTotal	0.65	0.043	(p<0.05)
sLMW/sTotal	-0.67	0.033	(p<0.05)
sMMW/sTotal	-0.39	0.26	N.S.
sHMW/sTotal	-0.09	0.80	N.S.

s:sandwich EIA, i:ICT-EIA

アディポネクチン指数を含むバイオマーカーとeGFRステージの関係を図10に示す。従来のバイオマーカーであるアルブミン、sT-AN、sH-ANは、G3bおよびG4ステージで上昇する傾向があったが、eGFRとの相関は見られなかった。一方、LMWアディポネクチンは同様に、G3bおよびG4ステージで上昇する傾向があり、eGFRとは有意な高い相関係数を示した(表6)。さらに、sLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比は、他のバイオマーカーとは異なり、初期段階から増減傾向を示しており、eGFRとは有意な高い相関係数を示した。これらのことより、sLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比は、初期段階から変動するバイオマーカーである可能性が示された。

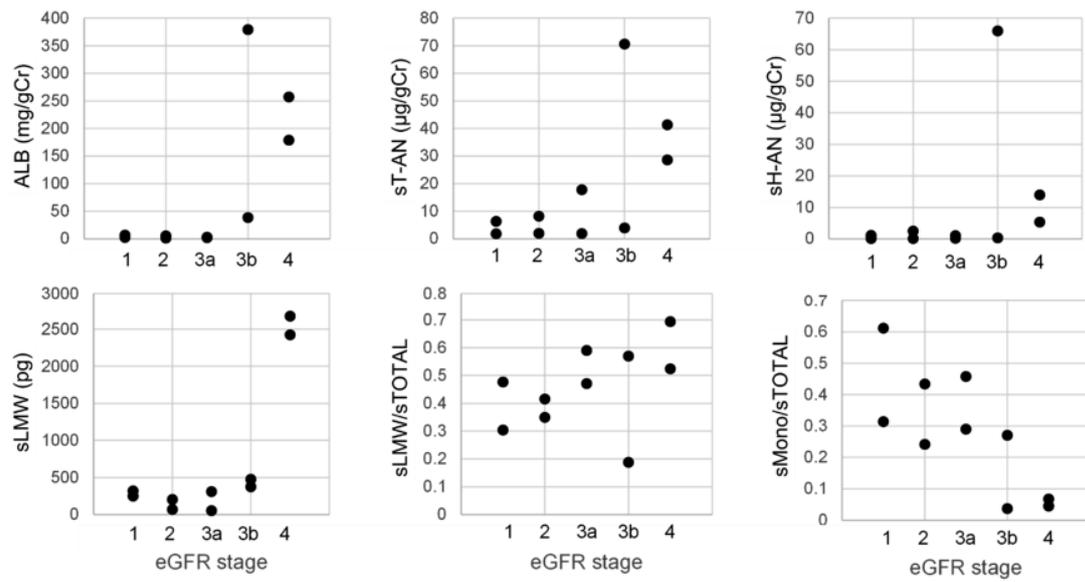


図10 eGFRの病期に応じた尿中バイオマーカー/指標値の傾向。

第3項 アディポネクチン指数の推定

LMW/総アディポネクチン比およびモノマー/総アディポネクチン比は、初期の糖尿病性腎疾患の変化を反映する有用なバイオマーカーであることが示されたが(表6)、SECによるサンプル分析は時間と労力を要し、実際の医療現場で使用するには向いていない。そこで、尿サンプルから直接測定したサンドイッチEIA、ICT-EIAによるT-AN、H-AN測定の結果から、sLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比の値を推定する可能性を検討した。

T-ANとH-ANをサンドイッチEIAとICT-EIAで測定し、測定値を用いた指標を算出した。これらの指標とsLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比の値との相関関係を表7に示す。いずれの指標を使用してもsLMW/sTotal比の値を推定することは困難であった。一方、サンドイッチEIAおよびICT-EIAで測定されたT-ANおよびH-ANの値は、sMonomer/sTotal比の値とよく相関していた。さらに、サンドイッチEIAとICT-EIAによって測定されたT-ANの比率は、sMonomer/sTotal比と強く相関し、糖尿病性腎疾患の進行を反映する潜在的な指標として新たに特定された。

表7 尿中バイオマーカー/インデックス値、sLMW/sTotalおよびsMonomer/sTotal間の相関。解析にはスピアマンの相関係数を使用した。

Biomarker/Index		r	p	
sLMW/sTotal	sT-AN	0.25	0.49	N.S.
	iT-AN	0.26	0.47	N.S.
	sT-AN/iT-AN	-0.18	0.63	N.S.
	sH-AN	0.16	0.65	N.S.
	iH-AN	0.16	0.65	N.S.
	sH-AN/iH-AN	0.067	0.85	N.S.
	sT-AN/sH-AN	0.055	0.88	N.S.
	sT-AN/iH-AN	0.018	0.96	N.S.
	iT-AN/sH-AN	0.14	0.70	N.S.
iT-AN/iH-AN	0.055	0.88	N.S.	
sMono/sTotal	sT-AN	-0.93	0.0001	<0.001
	iT-AN	-0.89	0.0005	<0.001
	sT-AN/iT-AN	0.94	<0.0001	<0.0001
	sH-AN	-0.90	0.0003	<0.001
	iH-AN	-0.90	0.0003	<0.001
	sH-AN/iH-AN	0.36	0.31	N.S.
	sT-AN/sH-AN	0.81	0.0049	<0.01
	sT-AN/iH-AN	0.79	0.0061	<0.01
	iT-AN/sH-AN	0.73	0.016	<0.05
	iT-AN/iH-AN	0.75	0.013	<0.05

第4項 糖尿病性腎疾患の初期バイオマーカーとしての検証

合計77人の糖尿病患者(G1: 9、G2: 43、G3a: 14、G3b: 8、G4: 3人)から収集した尿サンプルは、サンドイッチEIAおよびICT-EIAによるT-ANおよびH-ANアッセイを使用して測定した。各eGFRステージのアディポネクチン指数と従来のバイオマーカーであるアルブミンの値を図11に示す。サンドイッチEIAとICT-EIAによるT-ANアッセイ値は、G1と比較して有意な上昇はしていない。一方、サンドイッチEIAとICT-EIAによるH-ANおよびアルブミンの両方は、G1と比較してG3bで有意な上昇傾向を示した。これらの傾向に対して、サンドイッチEIAとICT-EIAで測定されたT-ANの比率(sT-AN/iT-AN)は、G1と比較しG3aで有意な低下を示し、糖尿病性腎疾患の進行の潜在的な指標であることが新たに示された。

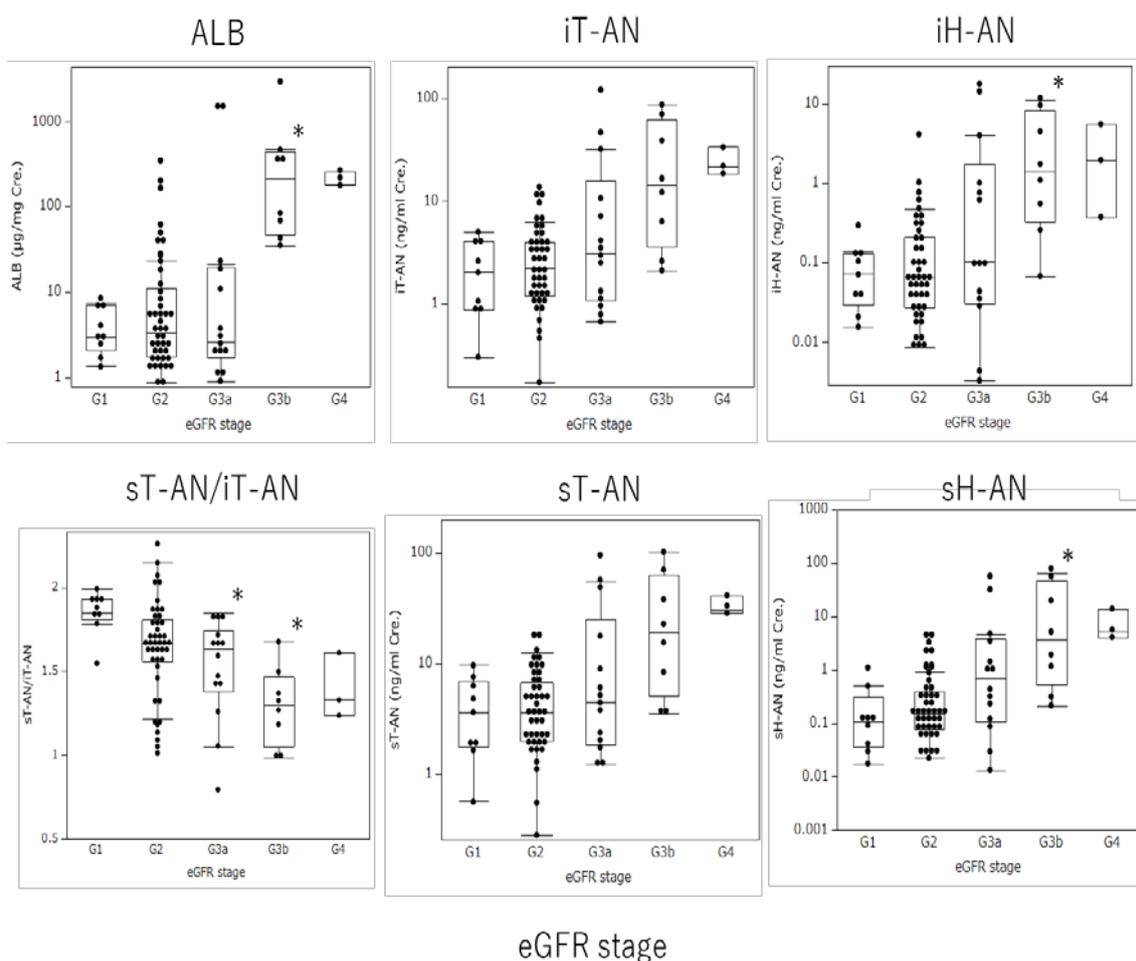


図11 尿中バイオマーカー/指標値およびeGFRステージのレベル。 * p < 0.05。

第4節 考察

ICT-EIAによるT-ANおよびH-ANアッセイは、糖尿病性腎疾患のバイオマーカーとしての可能性があることを第一章において報告した²²⁻²⁴⁾。この第二章の研究では、T-ANおよびH-ANのサンドイッチEIAを開発し、それらのそれぞれのアディポネクチン分子に対する反応性をICT-EIAと比較した。ICT-EIAでは、T-ANおよびH-ANアッセイの両法で、サンドイ

ッチEIAよりも高分子量アディポネクチンに対する反応性が高く、低分子量アディポネクチンに対する反応性は低いことがわかった(図8)。サンドイッチEIAとICT-EIAは同じ抗体ペアを使用するため、この反応性の違いはアッセイ形式が原因である可能性がある。免疫複合体を固相にトラップした後の洗浄により、免疫複合体を形成しなかった過剰の抗体試薬は除かれ、以降の転移反応過程では、免疫複合体の解離が起こることがわかっている²⁵⁾。また、この乖離は、高分子よりも低分子で高率に起こることが示されている。そのため、アディポネクチン免疫複合体の解離過程でも、低分子量のアディポネクチンを含む免疫複合体は、高分子量のアディポネクチンを含む免疫複合体よりも解離しやすいことが推察される。

次に、モノマーからHMWまでのすべてのアディポネクチンを高効率で検出できるT-ANサンドイッチEIAを使用して、糖尿病患者の尿中のモノマーおよびマルチマーアディポネクチンの存在量を調べた(図2)。以前の報告では、ICT-EIA^{22,23)}を使用して同様の分析を行った報告と同じく、eGFRステージが進んだ尿にHMWアディポネクチンが多く含まれていることがわかった。本研究では、より詳細な分析のために、G1-G4の25パーセントイルと75パーセントイルの被験者からの尿サンプル(合計10サンプル)を、測定前にSECによってサイズ分画し、モノマー、LMW、MMW、HMWアディポネクチンを測定し、それらの総アディポネクチンに対する存在するモノマー、LMW、MMW、およびHMWアディポネクチンの量の比率(アディポネクチン指数)を計算した。算出されたアディポネクチン指数とeGFRとの相関は、sLMW、sLMW/sTotal比、およびsMonomer/sTotal比が比較的強い相関を示した(表6)。その中で、sLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比は、eGFR低下の初期段階から変動する傾向があった(図10)。比較的軽度のeGFRステージの患者から採取された尿は、主にモノマーとLMWアディポネクチンを含み、糖尿病性腎疾患が進行するにつれて、MMWとHMWアディポネクチンがより多くなる傾向が観察された。その為、尿中の比較的分子量のアディポネクチンは初期の腎臓疾患によって引き起こされた変化を反映している可能性があることを示唆している。ただし、sLMW/sTotal比およびsMonomer/sTotal比の計算には、SECによるサイズ分画が必要であり、時間と労力がかかるため、臨床試験としては向いていない。そこで、これらの比率を推定する方法を検討した。尿サンプルは、サンドイッチEIAおよびICT-EIAによるT-ANおよびH-ANアッセイの4つのアッセイで測定し、アッセイ結果はアディポネクチン指数の計算に使用した。sLMW/sTotal比、sMonomer/sTotal比およびそれぞれのアディポネクチン指数の間の相関を調べた(表7)。その結果、いずれかの指標を使用してsLMW/sTotal比を推定することは困難であったが、いくつかの指標は、sMonomer/sTotal比と比較的強い相関を示し、糖尿病性腎疾患の新しい指標として役立つ可能性がある。

最後に、糖尿病性腎疾患の新たな指標として、サンドイッチEIAとICT-EIAによるT-ANの比率の有用性を検討した(図11)。アルブミンや多くの指標は、G3bからのみG1と比較して有意な変化を示したが、T-ANの比率(sT-AN/iT-AN)はG3aとの有意差を示し、糖尿病性腎疾患の新しい指標として役立つ可能性があることを示唆している。

第5節 結論

本研究では、T-AN および H-AN のサンドイッチ EIA を開発し、それらのそれぞれのアディポネクチン分子に対する反応性を ICT-EIA と比較した。糖尿病性腎患者の尿中アディポネクチンは、病態が進行するにつれて、モノマーおよび LMW から高分子量アディポネクチン(MMW および HMW)へ移行した。さらに、低分子アディポネクチンの LMW/総アディポネクチン比およびモノマー/総アディポネクチン比率は、初期の eGFR 変動の段階から変化することがわかった。さらに、サンドイッチ EIA と ICT-EIA による T-AN の比率 (sT-AN/iT-AN)を計算することにより、モノマー/総アディポネクチン比を推定することができ、この指標が初期の糖尿病性腎症のバイオマーカーとして有用である可能性を示した。結論として、私たちはサンドイッチ EIA による尿中アディポネクチン濃度の新しい簡易アッセイを確立し、アディポネクチンの尿漏出が糖尿病患者の腎機能の悪化の早期指標となる可能性を示した。

しかし、この研究は、健康な個人との比較が行われておらず、また、限られた数の臨床データによる横断的研究であること、さらに、対象糖尿病性腎症検体が、生検などによって正確に診断されていないなどの問題もあり、糖尿病患者の腎機能の悪化の早期指標とするには十分ではない。今後は、現在進行中のより大規模な前向き研究により、糖尿病性腎症のバイオマーカーとしての尿中アディポネクチンレベルの有用性を検証する必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました愛媛大学 大学院医学系研究科分子・機能領域 糖尿病内科学講座 橋田誠一客員教授に深く感謝いたします。

本論文を終えるにあたり、抗体や測定システムについて御指導、御鞭撻を賜りましたシスメックス株式会社R&D部門 渡辺敏弘先生に深く感謝いたします。

本論文を終えるにあたり、被験者サンプルを提供頂きました徳島大学 糖尿病臨床・研究開発センター 松久宗英教授、森博康助教、石津将先生、徳島大学病院糖尿病対策センター 船木真理特任教授、秦明子特任助教に深く感謝いたします。

本論文を終えるにあたり、資材等を提供頂きましたシスメックス株式会社クリニカルイノベーション本部 岡田正規様、河合昭典様、森本彩様、西山舞様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、御協力くださいました元徳島文理大学健康科学研究所 藤本侑希先生、藍場元弘先生、元徳島文理大学人間生活学部食物栄養学科 藍場美奈先生、久栄由美子様に心より深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

方法と試薬

緩衝液

0.1M塩化ナトリウム(NaCl)を含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、1.0 mM塩化マグネシウム(MgCl₂)、0.1%アジ化ナトリウム(NaN₃)、および0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を、尿サンプルの透析と希釈に使用した。検出抗体コンジュゲートの希釈には0.1% BSA、0.15 M NaCl、1.0 mM MgCl₂、0.1 mM塩化亜鉛(ZnCl₂)、0.1%NaN₃を含む0.1 M 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH 6.5)を使用した。捕捉抗体コンジュゲートの希釈には、MgCl₂とZnCl₂を含まない同じ組成の緩衝液を使用した。ICT-EIAの溶出緩衝液には、2.5 mM N ϵ -DNP-L-リジン塩酸塩(DNP)、2%カゼインナトリウムおよび0.1% NaN₃を含む0.1 M MES緩衝液(pH 6.5)を使用した。測定系の洗浄には、HISCL洗浄液(シスメックス、兵庫、日本)を使用した。

抗体と抗原

T-ANの測定のために、モノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(製品コード：MAB10651、クローン：166126、抗体レジストリ：AB_2221612)およびモノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(製品コード：MAB1065、クローン：166128、抗体レジストリ：AB_2273512)を使用した。H-ANの測定のために、モノクローナルマウス抗ヒトアディポネクチン/Acrp30抗体(クローン：38、シスメックス、兵庫、日本)を、H-ANアッセイの捕捉抗体と検出抗体の両方に使用した。また、リコンビナントヒトアディポネクチン(オリエンタル酵母、東京、日本)をキャリブレーションとして使用した。

捕捉および検出抗体コンジュゲートの調製

・T-AN測定系

PIERCE SATA(N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート)(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)を使用し、チオール基を捕捉抗体(クローン:166126)IgGに導入し、6-マレイミドヘキサノイル-DNPおよび6-マレイミドヘキサノイル-ビオチンと結合させ、補足用コンジュゲートとした^{26,27)}。検出抗体(クローン:166128)をペプシン(Roche, Basel, Switz)でF(ab')₂に消化し、さらに還元してFab'を得た。還元Fab'は、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(Dojindo、熊本、日本)を使用して、マレイミド基を導入したアルカリホスファターゼ(東洋酵母、東京、日本)と結合させ、検出用コンジュゲートとした^{30,31)}。

・H-AN測定系

上記T-AN測定系のコンジュゲートと同様の操作により、捕捉抗体(クローン:38)コンジュゲートおよび検出抗体(クローン:38)コンジュゲートを作成した^{30,31)}。

・磁性ビーズの調整

磁性粒子(JSR、東京、日本)に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(同仁堂、熊本、日本)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(東京化学工業、東京、日本)を使用し、表面にカルボキシル基を付加した。この磁性ビーズに、モノクローナルマウス抗DNP抗体(クローン:1853、シスメックス、兵庫、日本)を反応させた(抗DNP抗体磁性粒子)。同様に、ビオチニル-BSAを反応させ、ついで、ストレプトアビジン(MilliporeSigma, St.Louis, MO)を加え反応させた(ストレプトアビジン磁性粒子)^{26,27)}。

アディポネクチンのICT-EIAとサンドイッチEIA

全ての測定は、高感度自動測定機械であるHI-1000(シスメックス、兵庫、日本)によって行われた。

・T-ANのプロトコル(図12)

サンプル70 μ Lを検出抗体コンジュゲート40 μ Lと混合し、3.4分間インキュベートする。その後40 μ Lの捕捉抗体コンジュゲートを添加し、23.8分間インキュベートする。20 μ Lの抗DNP抗体磁性粒子を添加した後、11.3分間インキュベートする。洗浄後、110 μ Lの溶出緩衝液で4.6分間インキュベートする。磁性粒子を磁化した状態で、免疫複合体を含む反応溶液の上清80 μ Lを取り、別のバイアルに移動させる。30 μ Lのストレプトアビジン磁性粒子を添加し5.3分間インキュベートする。これまでのすべての反応は37 $^{\circ}$ Cで行う。ビーズを洗浄した後、結合したアルカリホスファターゼ活性を、HISCL基質試薬セット(シスメックス、兵庫、日本)を用いた化学発光により42 $^{\circ}$ Cで5.0分間発光させた。

・H-ANのプロトコル(図12)

サンプル70 μ Lを検出抗体コンジュゲート40 μ Lと混合し、5.8分間インキュベートする。その後40 μ Lの捕捉抗体コンジュゲートを添加し、9.4分間インキュベートする。20 μ Lの抗DNP抗体磁性粒子を添加した後、11.3分間インキュベートする。以降の過程は上記 T-ANのプロトコルと同様。

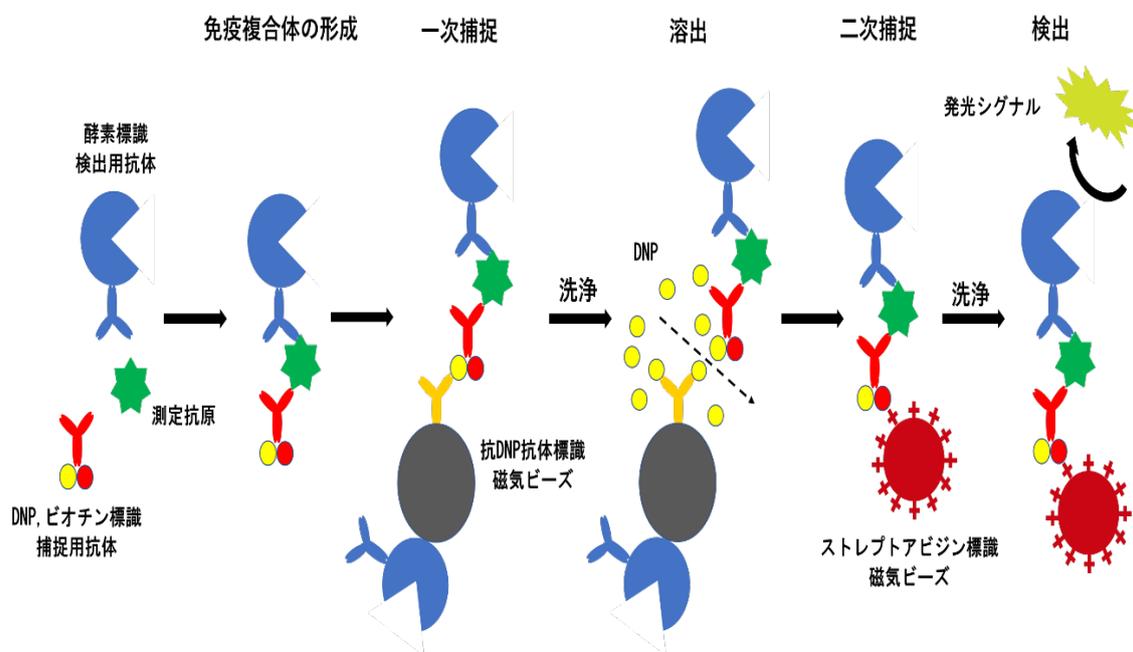


図12 ICT-EIAの分析スキーム。

すべての反応はHI-1000で行われる。液相で形成された免疫複合体は、抗DNP抗体ビーズによって捕捉される。洗浄後、免疫複合体は大量のDNP-Lysの添加により液相に溶出され、ストレプトアビジンビーズによって再捕捉される。2回目の洗浄後、酵素-基質反応によって生成される発光の量で測定される²⁸⁾。

サンドイッチEIAによるT-ANおよびH-ANアッセイ

・T-ANおよびH-ANのプロトコル(図13)

サンドイッチEIAによるT-ANおよびH-ANアッセイのプロトコルは、次のとおりである。30 μ lのサンプルを80 μ lの捕捉および検出抗体コンジュゲートと混合し、1.0分間インキュベートした。30 μ lのstreptavidinでコーティングされた磁性粒子を添加し、14分間インキュベートした。洗浄後、結合アルカリホスファターゼ活性を、HISCL基質試薬セット(シスメックス、兵庫、日本)を用いた化学発光により42 $^{\circ}$ Cで5.0分間アッセイした。

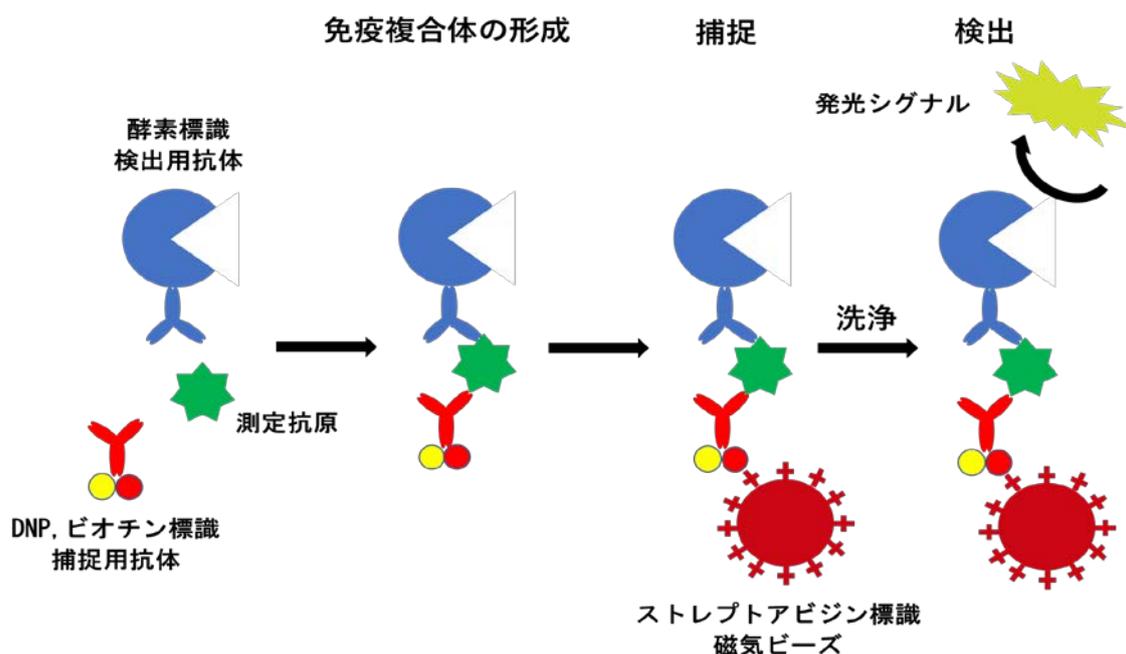


図13 サンドイッチEIAの分析スキーム。

すべての反応はHI-1000で行われる。液相で形成された免疫複合体は、streptavidinビーズによって捕捉される。洗浄後、酵素-基質反応によって生成される発光の量で測定される²⁸⁾。

アッセイの特性評価

検量線は、T-AN測定の場合は0~1000 pg/mlのレンジにまたがる9つのキャリブレーション、H-AN測定の場合は0~10,000 pg/mlのレンジにまたがる6つのキャリブレーションで作成した。検出限界は、低濃度サンプルの平均に3標準偏差(3SD)を加えたものに相当する濃度として計算された。再現性を決定するためにキャリブレーションを10回測定し、変動係数を計算した。希釈直線性評価は、透析した尿サンプルを希釈バッファで希釈し、4つの新しい濃度を作成した。これらの4つの希釈液と元のキャリブレーションをそれぞれ3回測定し、元のサンプルの濃度と、希釈されたサンプルの濃度、それらの希釈係数から計算された予想濃度との差を比較した。

対象とサンプル

対象は、徳島県で実施されたコホート研究から非糖尿病被験者7名、徳島大学病院に通院している1型、2型糖尿病患者77名とした。患者の背景は38/39(男性/女性)、62(52-69)歳(中央値、25%-75%)、31/46(T1DM/T2DM)、9/42/14/8/3(G1/G2/G3a/G3b/G4ステージ)。非糖尿病被験者は、空腹時血糖値が126 mg/dl未満、HbA1cが6.5%未満、糖尿病治療薬が処方されていないという3つの条件を満たしている者とした。糖尿病患者は、日本糖尿病学会の診断基準に従って医師により診断された者とした²⁹⁾。血液サンプルは、被験者の肘前静脈から採取した。一晩絶食した後、早朝第一尿を採取した。尿サンプル(10 ml)を0.1 mlの10%BSAおよびNaN₃と混合した。その後、セルロースチューブに入れ4°Cで一晩透析バッファにて透析を行った。透析された尿サンプルは、-30°Cで凍結保存した。

尿の分画

一章では、糖尿病患者の中から正常アルブミン尿症、微量アルブミン尿症、およびアルブミン尿症の患者をそれぞれランダムに選択した3つの尿サンプル(1.0 ml)を、HiLoad 16/60 Superdex 200(1.6×60 cm)(GE Healthcare、東京、日本)のカラムでAKTA explorer 10S(GE Healthcare、東京、日本)を使用してSECによって分離した。各画分のフラクションをT-ANおよびH-ANアッセイに使用した。二章では、患者からランダムに選択した2つの尿サンプル(1.0 mL)と組換えヒトアディポネクチン(オリエンタル酵母、東京、日本)を分離した。各画分をサンドイッチEIAおよびICT-EIAによるT-ANおよびH-ANアッセイに使用した。G1-G4ステージの25パーセントイルと75パーセントイル(合計10サンプル)の被験者から尿を選択したのち、同じプロトコルを使用して分離し、T-ANアッセイのために各画分を測定した。HMW、MMW、LMW、およびモノマーアディポネクチンの濃度は、それぞれフラクションNo. 50-52、54-56、62-64、および85-89の濃度に基づいて計算した。

尿中のバイオマーカーの測定

透析した尿サンプルは、T-AN、H-ANおよびアルブミン²¹⁾は、ICT-EIAを使用して測定を行った。尿中クレアチニンは、市販のクレアチニン測定キット(FUJIFILM和光純薬株式会社、大阪、日本)を使用し測定を行った。尿中アディポネクチンと尿中アルブミンの濃度は、尿中クレアチニン(Cr)濃度で補正した。SEC分画後の尿サンプルもT-ANおよびH-ANの測定を行った。

統計分析

バイオマーカーの測定値が正規分布しているかどうかについては、シャピロ-ウィルク検定を使用した。バイオマーカー相関分析では、スピアマンの相関係数を使用した。複数のグループ間の差異を比較するためには、マン・ホイットニーのU検定、クラスカル・ウォリス検定とスチール・ドワズ検定を使用し、有意性5%を差ありとした。バイオマーカー/インデックス相関分析では、スピアマンの相関係数を使用した。サンプルサイズが小さいため、p値は正確でない場合があるが、参照用に記載している。

倫理的配慮

この研究は、徳島文理大学の倫理委員会(No. H29-17)および徳島大学病院の倫理委員会(糖尿病患者はNo. 2894-1、非糖尿病患者はNo. 3087)によって承認された研究である。すべての被験者に対し書面によるインフォームドコンセントを行った。非糖尿病被験者は、徳島大学病院の倫理委員会(第662号)によっても承認されたコホート研究の参加者であり、このコホート研究においても書面によるインフォームドコンセントを行った。

参考文献

1. Levey, A. S. et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 67, 2089–2100 (2005).
2. Sarnak Mark, J. et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease. *Circulation* 108, 2154–2169 (2003).
3. Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, et al. Clinical manifestations of kidney disease among US adults with diabetes, 1988–2014. *JAMA* 2016;316:602-10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.10924>.
4. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003;63:225-32. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00712.x>.
5. Yamanouchi M, Furuichi K, Hoshino J, et al. Nonproteinuric versus proteinuric phenotypes in diabetic kidney disease: a propensity score-matched analysis of a nationwide, biopsy-based cohort study. *Diabetes Care* 2019;42:891-902. <https://doi.org/10.2337/dc18-1320>.
6. Chen C, Wang C, Hu C, et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease. *Front Med* 2017;11:310-8 <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0542-7>.
7. Yokoyama H, Sone H, Oishi M, et al. Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15). *Nephrol Dial Transplant* 2009;24. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn603>. 1212-1219.
8. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 39, S1-266 (2002).
9. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1645-56. <https://doi.org/10.1172/JCI32691>.
10. von Eynatten M, Liu D, Hock C, et al. Urinary adiponectin excretion: a novel marker for vascular damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 2009. ;58:2093-9. <https://doi.org/10.2337/db09-0204>.
11. Koshimura, J. et al. Urinary adiponectin excretion is increased in patients with overt diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 165–169 (2004).
12. Jorsal, A. et al. Urinary adiponectin excretion rises with increasing albuminuria in type 1 diabetes. *J. Diabetes Compl.* 27, 604–608(2013).
13. Yamakado, S. et al. Urinary adiponectin as a new diagnostic index for chronic kidney disease due to diabetic nephropathy. *BMJ Open Diabetes Res. Care* 7, e000661 (2019).

14. Panduru, N. M. et al. Urinary adiponectin is an independent predictor of progression to end-stage renal disease in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 38, 883–890 (2015).
15. Shimotomai, T. et al. Enhanced urinary adiponectin excretion in IgA-nephropathy patients with proteinuria. *Ren. Fail.* 27, 323–328(2005).
16. Rovin, B. H. et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* 68,1825–1833 (2005).
17. Fujita, H. et al. Possible relationship between adiponectin and renal tubular injury in diabetic nephropathy. *Endocr. J.* 53, 745–752(2006).
18. von Eynatten, M. et al. Urinary adiponectin excretion: a novel marker for vascular damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 58,2093–2099 (2009).
19. Kopf, S. et al. Urinary excretion of high molecular weight adiponectin is an independent predictor of decline of renal function in type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 51, 479–489 (2014).
20. Loghman, M. et al. Association between urinary adiponectin level and renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Int. J.Rheum. Dis.* 19, 678–684 (2016).
21. Yamamoto, M., Fujimoto, Y., Hayashi, S. & Hashida, S. A study of high-, middle- and low-molecular weight adiponectin in urine as a surrogate marker for early diabetic nephropathy using ultrasensitive immune complex transfer enzyme immunoassay. *Ann.Clin. Biochem.* 55, 525–534 (2018).
22. Yamamoto, M., Fujimoto, Y., Hayashi, S., & Hashida, S. A study of high-, middle- and low-molecular weight adiponectin in urine as a surrogate marker for early diabetic nephropathy using ultrasensitive immune complex transfer enzyme immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 55(5), 525–534, <https://doi.org/10.1177/0004563217748681> (2018).
23. Watanabe T et al. Development of fully automated and ultrasensitive assays for urinary adiponectin and their application as novel biomarkers for diabetic kidney disease. *Sci Rep.* 10(1), 15869, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72494-6> (2020).
24. Ishizu M, Mori H, Ohishi M, Kuroda A, Akehi Y, Yoshida S, Aihara KI, Aiba M, Kawano T, Hashida S, Matsuhisa M. Urinary adiponectin excretion is an early predictive marker of the decline of the renal function in patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 35(4), 107848, <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107848> (2021)
25. Watanabe, T., & Hashida, S. (2018). The immune complex transfer enzyme immunoassay: Mechanism of improved sensitivity compared with conventional sandwich enzyme immunoassay. *J Immunol Methods.* 459, 76–80, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.05.010> (2018).
26. Hashida, S. & Ishikawa, E. Detection of one milliattomole of ferritin by novel and ultrasensitive enzyme immunoassay. *J. Biochem.*108, 960–964 (1990).

27. Hashida, S., Hashinaka, K. & Ishikawa, E. Ultrasensitive enzyme immunoassay. In *Biotechnology Annual Review* (ed. El-Gewely, M. R.) Vol. 1 403–451 (Elsevier, New York, 1995).
28. Watanabe, T. & Hashida, S. The immune complex transfer enzyme immunoassay: Mechanism of improved sensitivity compared with conventional sandwich enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* 459, 76–80 (2018).
29. The Committee of the Japan Diabetes Society on the Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus et al. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Investig.* 1, 212–228 (2010).